

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: (Biomedicína-obor Neurovědy)



**Mgr. Bohdana Hrušková**

Studium funkčních vlastností receptorů pro GABA  
a glycin v MNTB savců

Function of the GABA and glycine receptors  
in the mammalian MNTB

Dizertační práce

Školitel: RNDr. Rostislav Tureček, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.,

Odd. neurofyzologie sluchu,

Laboratoř synaptické fyziologie, Praha

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29. 5. 2017

.....

Bohdana Hrušková

Identifikační záznam:

HRUŠKOVÁ, Bohdana. Studium funkčních vlastností receptorů pro GABA a glycin v MNTB savců. [Function of the GABA and glycine receptors in the mammalian MNTB]. Praha 2017. 130 s., 5 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Oddělení neurofyzologie sluchu, Laboratoř synaptické fyziologie, Praha. Vedoucí práce Tureček, Rostislav.

### *Poděkování:*

Děkuji všem, s jejichž podporou mohla vzniknout tato práce, nejprve pak svému školiteli, RNDr. Rostislavu Turečkovi, Ph. D., za odborné vedení a umožnění práce na velmi zajímavých výzkumných projektech. Věnoval mi mnoho času a trpělivě mě učil provádění elektrofyziologických pokusů, poskytl neocenitelnou pomoc a rady při analýze získaných dat i při psaní odborných prací. Dále bych chtěla poděkovat kolegyním z Laboratoře synaptické fyziologie, Oddělení neurofyziologie sluchu ÚEM AV ČR, jmenovitě Mgr. Johaně Trojanové, Ph. D. a Ing. Michaele Králíkové, Ph.D. rady a pomoc při provádění pokusů a za příjemné pracovní prostředí. Poděkování bych také ráda vyjádřila Prof. J. G. G. Borstovi z Oddělení neurověd, Erasmus MC, Rotterdam, který mi umožnil nahlédnout do problematiky snímání *in vivo* a A. Klugovi, Ph. D. z Oddělení biologie II, Ludwig-Maximilians-University, Mnichov, který mi umožnil provedení pokusů technikou vodivostního zámku. V neposlední řadě pak děkuji své rodině, jejíž členové mi poskytli bezvýhradnou podporu v mé práci.

## Obsah

1.	Úvod .....	11
1.1.	Centrální část sluchové dráhy savců .....	12
1.2.	Komplex jader olivy superior .....	13
1.3.	Mediální jádro trapézovitého tělesa .....	14
1.3.1.	Vývoj a struktura Heldovy synapse .....	16
1.3.2.	Vlastnosti synaptického přenosu v MNTB .....	17
1.3.3.	Odpověď hlavních neuronů MNTB na zvuk .....	19
1.4.	Glycinové receptory .....	20
1.4.1.	Podjednotkové složení a struktura GlyR .....	20
1.4.2.	Vlastnosti GlyR .....	22
1.4.3.	Odpověď GlyR v závislosti na intracelulární koncentraci Cl <sup>-</sup> .....	23
1.4.4.	Rozmístění GlyR v nervové soustavě .....	24
1.4.5.	Vývojové změny v expresi a funkci GlyR a regionální distribuce izoforem .....	24
1.4.6.	Patologické stavy spojené s GlyR .....	25
1.5.	GABA receptory .....	26
1.5.1.	Struktura GABA <sub>B</sub> receptorů .....	26
1.5.2.	Rozmístění GABA <sub>B</sub> receptorů v centrálním nervovém systému .....	28
1.5.3.	Látky ovlivňující aktivitu GABA <sub>B</sub> receptorů .....	29
1.5.4.	Aktivace G-proteinu GABA <sub>B</sub> receptorem .....	29
1.5.5.	Fyziologická role GABA <sub>B</sub> receptorů v centrálním nervovém systému .....	30
1.6.	Vápníkem aktivované draslíkové kanály .....	32
1.6.1.	Struktura SK kanálů .....	32
1.6.2.	Aktivace a biofyzikální vlastnosti SK kanálů .....	33
1.6.3.	Chemické látky ovlivňující aktivitu SK kanálů .....	34
1.6.4.	Fyziologická úloha SK kanálů .....	34
2.	Cíle práce .....	36
3.	Materiál a metody .....	37
3.1.	Zvířata použita v pokusech .....	37
3.2.	Kochleární ablace .....	37
3.3.	Příprava řezů pro elektrofyziologické pokusy .....	38
3.4.	Elektrofyziologické metody .....	39
3.4.1.	Experimentální roztoky .....	39
3.4.2.	Vizualizace a identifikace buněk .....	40
3.4.3.	Technika terčíkového zámku .....	42

3.4.4.	Snímání synaptických a membránových potenciálů a proudů. ....	42
3.4.5.	Aplikace roztoků látek ovlivňujících aktivitu receptorů a inotových kanálů .....	44
3.4.6.	Analýza a statistické zpracování naměřených dat .....	44
3.4.7.	Imunohistochemie .....	45
3.5.	Extracelulární snímání elektrické aktivity MNTB neuronů <i>in vivo</i> .....	47
3.5.1.	Přípravná operace pro snímání z MNTB <i>in vivo</i> .....	47
3.5.2.	<i>In vivo</i> elektrofyziologie a aplikace látek selektivně ovlivňujících aktivitu GABA <sub>B</sub> receptoru.....	48
3.5.3.	Zvuková stimulace <i>in vivo</i> .....	49
3.5.4.	Analýza dat získaných pokusy <i>in vivo</i> .....	49
4.	Výsledky.....	51
4.1.	Studium podjednotkového složení GlyR na Heldově synapsi.....	51
4.1.1.	Postsynaptické GlyR v MNTB.....	52
4.1.2.	Synapticky aktivované GlyR v MNTB .....	54
4.1.3.	Lokalizace postsynaptických GlyR v MNTB.....	61
4.1.4.	Presynaptické receptory v MNTB .....	62
4.2.	Vliv kochleární aktivity na vývojové změny inhibičního systému v MNTB .....	67
4.3.	Modulační vliv GABA <sub>B</sub> receptorů na aktivitu neuronů myšího MNTB <i>in vivo</i> .....	70
4.3.1.	Regulace aktivity MNTB neuronů farmakologicky aktivovanými GABA <sub>B</sub> receptory	71
4.3.2.	Sledování tonické přítomnosti GABA v MNTB <i>in vivo</i> .....	74
4.4.	Modulace excitačního synaptického přenosu v MNTB postsynaptickými GABA <sub>B</sub> receptory .....	76
4.4.1.	GABA <sub>B</sub> receptory na hlavních neuronech MNTB regulují posthyperpolarizační fázi postsynaptických AP .....	76
4.4.2.	Mechanismus mAHP u hlavních neuronů MNTB .....	78
4.4.3.	Membránová vodivost zprostředkující mAHP u hlavních neuronů MNTB.....	81
4.4.4.	Mechanismus modulace SK kanálů GABA <sub>B</sub> receptory.....	87
4.4.5.	Úloha modulace SK kanálů postsynaptickými GABA <sub>B</sub> receptory v excitačním synaptickém přenosu na Heldově synapsi. ....	89
5.	Diskuze .....	92
5.1.	Podjednotková složení GlyR u MNTB neuronů.....	92
5.2.	Vliv kochleární aktivity na vývojové změny inhibičního systému v MNTB .....	95
5.3.	Modulační vliv presynaptických GABA <sub>B</sub> receptorů na aktivitu neuronů myšího MNTB <i>in vivo</i> .....	97
5.4.	Modulace excitačního synaptického přenosu v MNTB postsynaptickými GABA <sub>B</sub> receptory .....	99
6.	Závěry:.....	103
Abstrakt	.....	104

Abstract .....	107
Seznam použité literatury .....	111
Přílohy .....	130

## Seznam zkratek

aCSF	arteficiální cerebrospinální roztok
AHP	posthyperpolarizační fáze akčního potenciálu
AMPA	receptor pro $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionovou kyselinu (ionotropní glutamátový receptor)
AP	akční potenciál
AVCN	anteroventrální kochleární jádro
BAPTA	1,2-bis-(2-amino fenoxý) ethan N,N,N',N' tetraoctová kyselina
BK	vápníkem aktivované draslíkové kanály s vysokou vodivostí
CaM	kalmodulin
CB1R	kanabinoidní receptor typu 1
CC	elektrofyzilogická technika proudového zámku
CGM	<i>corpus geniculatum mediale</i>
CPP	3-((R)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfónová kyselina
CsMeSO <sub>3</sub>	céziurní metan sulfonát
CTB	kyanotrifenyl borát
CTZ	cyklothiazid
DC	elektrofyzilogická technika vodivostního zámku
DNQX	6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion
eAP	extracelulárně snímaný akční potenciál
eCB	endogenní kanabinoid
eEPSP	extracelulárně snímaný excitační postsynaptický potenciál
EGTA	ethylenglykol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraoctová kyselina
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
EPSC	excitační postsynaptický proud
EPSC	excitační postsynaptická vodivost
EPSP	excitační postsynaptický potenciál
ER	endoplasmatické retikulum
GABA	$\gamma$ -amino máselná kyselina
GABA <sub>A</sub>	ionotropní receptor pro $\gamma$ -amino máselnou kyselinu
GABA <sub>B</sub>	metabotropní receptor pro $\gamma$ -amino máselnou kyselinu
GABA <sub>B1a</sub>	GABA <sub>B</sub> receptor obsahující GB1 podjednotku varianty a
GABA <sub>B1b</sub>	GABA <sub>B</sub> receptor obsahující GB1 podjednotku varianty b
GB1	podjednotka 1 GABA <sub>B</sub> receptoru



GB1a	sestříhová varianta a podjednotky 1 GABA <sub>B</sub> receptoru
GB1b	sestříhová varianta b podjednotky 1 GABA <sub>B</sub> receptoru
GB2	podjednotka 2 GABA <sub>B</sub> receptoru
GBC	globulární keříčkové buňky
GC	guanylát cykláza
GHB	γ-hydroxymáselná kyselina
GIRK	dovnitř usměřující draslíkové kanály GABA <sub>B</sub>
GlyR	glycinový receptor
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem
HVA	napětově závislé vápníkové kanály-typu high voltage activated (s vysokým prahem pro aktivaci)
IC	dolní kolikulus ( <i>colliculus inferior</i> )
IK	vápníkem aktivované draslíkové kanály se středně vysokou vodivostí
IPSC	inhibiční postsynaptický proud
K <sub>Ca</sub>	vápníkem aktivované draslíkové kanály
KCTD	člen rodiny proteinů obsahující doménu homologickou tetramerizační s doménou Kv kanálů
KO	zvířata s vyřazenou expresí určitého genu/proteinu
Kv	napětově závislé draslíkové kanály
LJP	potenciál vznikající na rozhraní mezi intracelulárním a extracelulárním roztokem
LNTB	laterální jádro trapézovitého tělesa
LSO	laterální oliva superior
LTP	dlouhodobá potenciace
mAHP	střední fáze posthyperpolarizace AP
mGluR	metabotropní glutamátový receptor
mIPSC	miniaturní (spontánní) inhibiční postsynaptický proud
NLL	jádra laterálního lemnisku
NMDA	N- methyl-D asparagová kyselina
NMDAR	N- methyl-D aspartátový receptor (ionotropní glutamátový receptor)
MNTB	mediální jádro trapezovitého tělesa
MSO	mediální oliva superior
P	udává den věku po narození zvířete
PC	hlavní neurony MNTB

PTX	picrotoxin
PVCN	posteroventrální kochleární jádro
PXN	picrotoxinin
SK	vápníkem aktivovaný draslíkový kanál s nízkou vodivostí
SK1	podjednotka SK kanálu typu 1
SK2	podjednotka SK kanálu typu 2
SK3	podjednotka SK kanálu typu 3
SK1 KO	myši s vyřazenou expresí na vápníku závislého draslíkového kanálu typu 1
SK2 KO	myši s vyřazenou expresí na vápníku závislého draslíkového kanálu typu 2
SOC	komplex jader olivy superior
SPN	superiorní paraolivární jádro
STD	krátkodobá synaptická deprese
TTX	tetrodotoxin
VC	elektrofyzilogická technika terčíkového zámku (napětového zámku)
VGCC	napětově závislé vápníkové kanály
VGNAC	napětově závislé sodíkové kanály
VNTB	ventrální jádro trapézovitého tělesa
v/v	objemová koncentrace [ <i>angl.</i> volume/volume – volume concentration (%)]
WT	myš divokého typu
w/v	hmotnostní koncentrace [ <i>angl.</i> mass/volume – mass concentration (%)]

## 1. Úvod

Nervový systém je hlavním řídícím a integrujícím systémem organismu. Jednou z jeho základních funkcí je rychlý a přesný přenos informací z receptorů, jejich centrální zpracování a vysílání nových signálů na efekторы. Výsledná změna chování organismu především zajišťuje stálost vnitřního prostředí a tak umožňuje přežití jedince.

Informace se šíří nervovým systémem formou elektrických a chemických signálů. Každým okamžikem registrují naše buňky obrovská množství informací. Přes složité neuronální sítě se informace předávají, až se nakonec dostanou k cílovým buňkám v těle. Komunikace mezi jednotlivými neurony je zajištěna úzce specializovanými buněčnými kontakty zvanými synapse. Většinu synapsí centrálního nervového systému savců tvoří synapse chemické. Přenos signálu je zde závislý na přítomnosti chemických látek - neuropřenašečů v presynaptických zakončeních. Neuropřenašeče jsou typicky uvolňovány z presynaptických zakončení a pomocí difúze dosahují postsynaptických membrán, kde se váží k specifickým bílkovinným strukturám – receptorům. Výsledkem vazby neuropřenašeče na receptor je aktivace receptoru, která vyvolá postsynaptickou odpověď a změnu aktivity příslušné buňky. Receptory registrují a do buňky přenášejí signály různými způsoby. Iontotropní receptory jsou ligandem řízené iontové kanály a zprostředkovávají rychlý synaptický přenos. Metabotropní receptory zprostředkovávají pomalý synaptický přenos, k němuž využívají trimerní G-proteiny. Podle toho, jak postsynaptická odpověď ovlivňuje aktivitu postsynaptické buňky, lze receptory s určitým zjednodušením klasifikovat též jako excitační a inhibiční. Aktivace první skupiny receptorů vede k depolarizaci a podráždění nervových buněk. Druhá skupina pak po své aktivaci vzrušivost neuronů snižuje. Podobně lze na excitační a inhibiční rozdělit i neuropřenašeče.

V naší práci jsme se zabývali studiem receptorů pro hlavní inhibiční přenašeče centrální nervové soustavy  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu (GABA) a glycin. Tyto receptory patří jednak do rodiny ionotropních, tzv. Cys-loop receptorů a jednak zahrnují metabotropní receptory ze třetí rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Mnoho komerčně používaných léčiv i zneužívaných látek ovlivňuje aktivitu GABA a glycinových receptorů. Kaskády dějů vedoucí ke konečnému terapeutickému efektu, či účinku drogy však nejsou zcela pochopeny. Objasnění mechanismů fungování inhibičních neuropřenašečů je přitom nutnou podmínkou pro vývoj nových anestetik, léčiv pro těžká onemocnění typu epilepsie, schizofrenie, úzkostných poruch, či chronické bolesti a pro terapeutické přístupy užívané pro odvykání drogové závislosti.

Vlastnosti receptorů pro inhibiční aminokyseliny jsme zkoumali na Heldově synapsi v mediálním jádře trapézovitého tělesa (MNTB) potkana a myši. MNTB je součástí sluchových jader mozkového kmene a představuje jednoduchý systém s dobře definovanými vztahy mezi vstupy a výstupy. V naší práci jsme se zaměřili na podjednotková složení pre- a postsynaptických GABA a glycinových receptorů a na jejich vývojové změny v tomto jádře. Také jsme zkoumali, jak se vlastnosti receptorů uplatňují při modulaci excitačního synaptického přenosu při jejich fyziologické aktivaci v *in vivo* podmínkách.

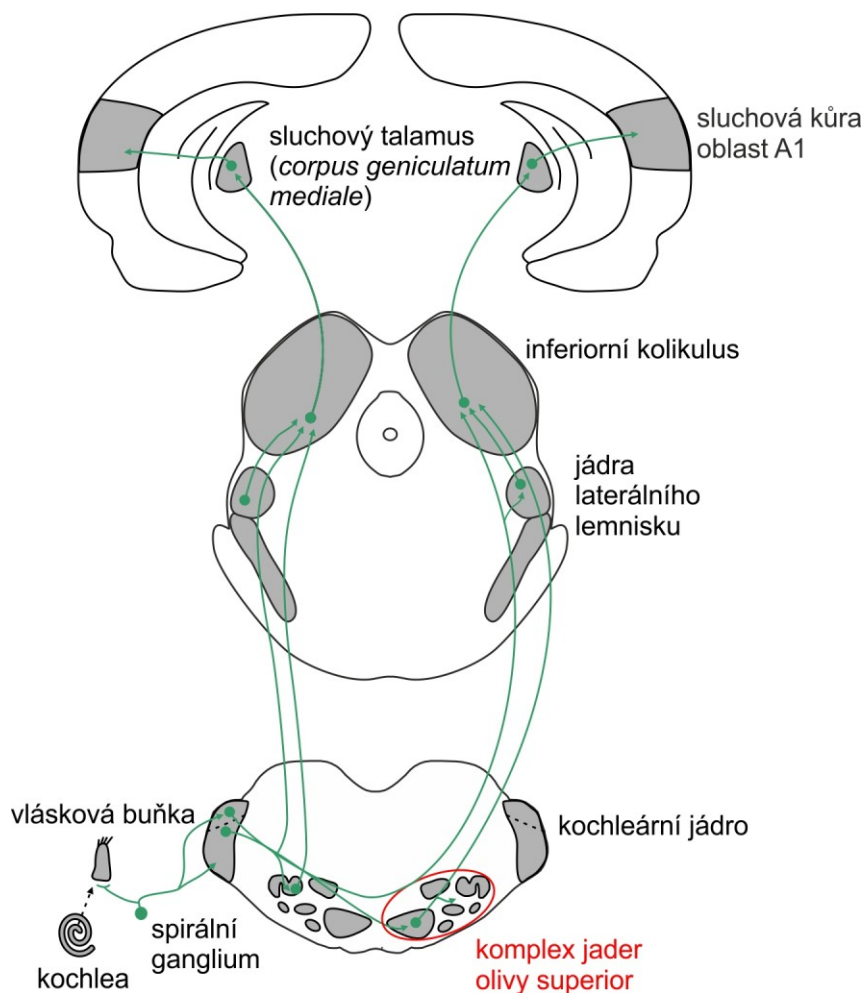
Věříme, že naše výsledky pomohou lépe pochopit mechanismy plasticity inhibičního a excitačního synaptického přenosu a zpracování zvuků ve sluchovém systému savců.

## 1.1. Centrální část sluchové dráhy savců

Hlavní funkcí sluchového systému je zajišťovat detekci a zpracování relevantních zvukových podnětů z okolí živočicha. Schematicky lze ascendentní průběh dráhy popsat (Obr.1): Ze spirálního ganglia vychází sluchový nerv, který vstupuje do kochleárních jader uložených v laterální prodloužené míše. Z ventrálního i dorzálního kochleárního jádra sluchová dráha pokračuje do jader uložených v mozkovém kmeni. Zde se dráha dělí do více paralelních kanálů. Z ventrálního kochleárního jádra vychází projekce ipsi- i kontralaterálně do komplexu jader horní olivy (SOC), kde je většina vláken přepojena. Vláknata vystupující z dorzálního kochleárního jádra obcházejí SOC a cestou *stria acustica dorsalis* směřují do jader laterálního lemnisku kontralaterální strany, kde dochází k jejich částečnému přepojení. Většina ascendentních vláken sluchové dráhy a to po i bez přepojení v jádrech mozkového kmene pokračuje cestou laterálního lemnisku do integračního centra středního mozku zvaného *colliculus inferior* (IC). Z IC probíhá vzestupná dráha do sluchového talamu (*corpus geniculatum mediale*; CGM). Většina vstupní informace přichází do CGM z IC, avšak některá vlákna z mozkového kmene IC obcházejí a směřují do talamu přímo. Na rozdíl od několika paralelních drah probíhajících mezi jádry mozkového kmene a středního mozku tak CGM talamu představuje povinnou přepojovací stanici pro všechna vlákna přinášející sluchu informaci korovým strukturám. Konečnou stanicí vzestupné sluchové dráhy je sluchová kůra, nacházející se ve spánkovém laloku koncového mozku (Tsuji and Liberman, 1997; Pickles, 2015).

Sluchová dráha vyniká mezi ostatními sensorickými drahami mozku zejména svou vysokou členitostí, bohatou komunikací mezi bilaterálně umístěnými párovými jádry a silnou eferentní kontrolou jednotlivých podkorových struktur. V celém svém průběhu si zachovává tonotopické uspořádání. Podobně jako u ostatních sensorických drah i zde podkorové struktury nepřenášejí

informaci pouze pasivně, ale podílejí se na předzpracování sluchových stimulů. Prominentní význam mají zejména nižší úrovně sluchové dráhy vyznačující se vysokou časovou senzitivitou.



**Obr. 1. Schématické znázornění sluchové dráhy**

Popis viz výše v kapitole 1.1. Upraveno podle (Purves et al., 2001)

## 1.2. Komplex jader olivy superior

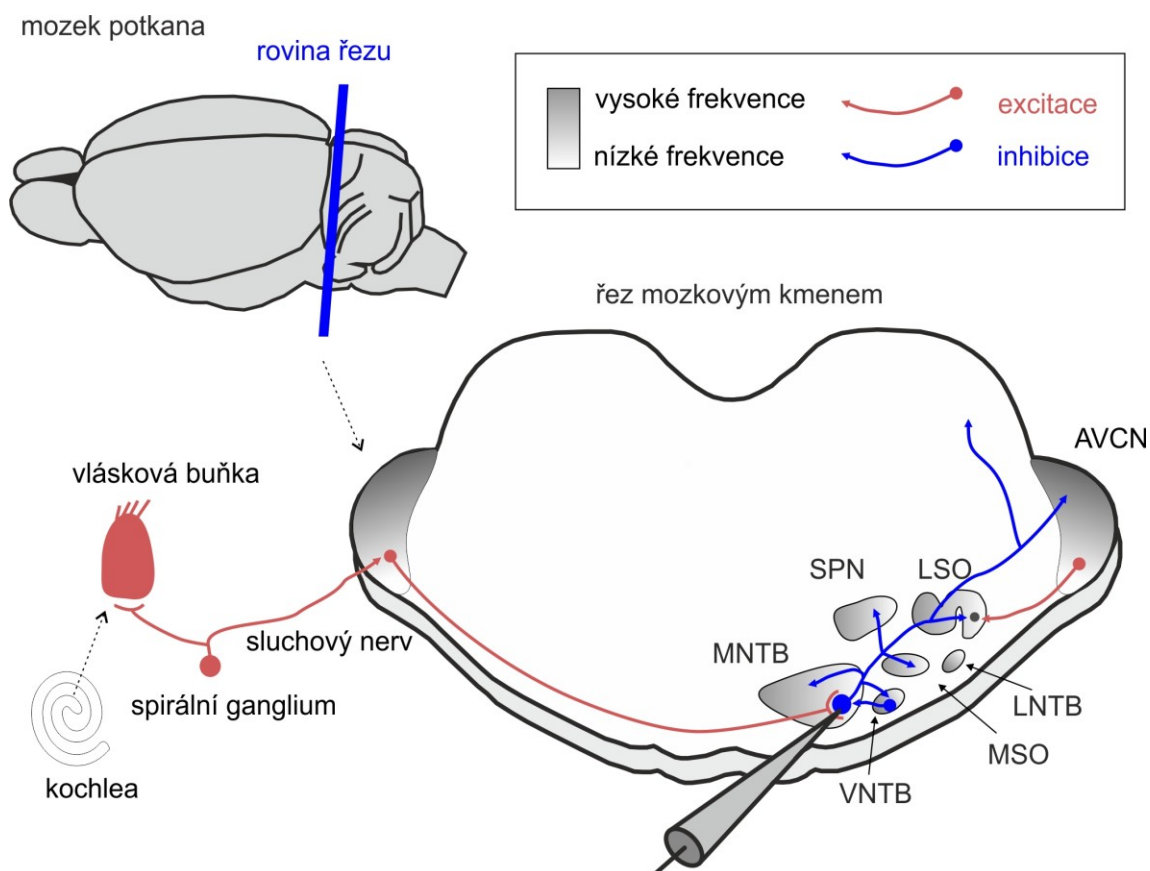
SOC je tvořen horním paraolivárním jádrem, mediální a laterální olivou superior (MSO a LSO), MNTB, ventrálním a laterálním jádrem trapézového tělesa (VNTB, LNTB), (viz Obr. 2).

SOC je klíčový pro binaurální slyšení. Představuje totiž první úroveň sluchového systému, kde se integrují informace z obou uší. Jedná se o systém klíčový pro stanovení polohy zdroje zvuku v horizontální rovině na základě interaurálního rozdílu v čase nebo intenzitě. Zvuky o nízké frekvenci jsou detekovány zejména na základě časového zpoždění zdroje zvuku. V klasickém pojetí zde hraje svou úlohu především MSO (Jercog et al., 2010; Middlebrooks, 2015). Rozdíly v intenzitě zvuku o vyšších frekvencích (u člověka se jedná o frekvence nad 2 kHz) jsou zpracovávány v LSO (Boudreau and Tsuchitani, 1968; Tsuchitani, 1997). Dle současné teorie založené na fosilních nálezích se zdá, že první savci, ze kterých se jejich ostatní druhy vyvinuly, detekovali zdroj zvuku hlavně na základě rozdílů v intenzitě zvuku. Také všichni doposud zkoumaní savci včetně člověka mají dobře vyvinutou LSO a využívají stejný způsob detekce rozdílů v intenzitě zvuku. Je pravděpodobné, že MSO se objevila až později v evoluci (Grothe, 2000; Grothe et al., 2010). Detekci na základě časového zpoždění zdroje zvuku využívají především savci vyznačující se nízkofrekvenčním rozsahem sluchového aparátu. Jedná se o větší suchozemské savce, ale i malé stepní hlodavce (pískomil), kteří obývají otevřené prostory. Tato zvířata komunikují či lokalizují predátory na dlouhé vzdálenosti, u kterých nejsou významné interaurální rozdíly v intenzitě zvuku (Lay, 1972). Ukazuje se, že obě jádra jsou v určité míře přítomna u savců s rozličným frekvenčním rozsahem slyšení. A bylo ukázáno, že LSO se podílí i na detekci časového zpoždění zdroje zvuku u nízkofrekvenčních zvuků a naopak MSO hraje roli v detekci rozdílů v intenzitě a to zejména u komplexních zvuků (Grothe, 2000; Grothe et al., 2010).

### **1.3. Mediální jádro trapézovitého tělesa**

Z periolivárních sluchových jader hraje nejvýznamnější roli MNTB (Obr. 2). Leží na ventrální straně mozkového kmene nejmediálněji ze všech jader SOC. MNTB je klíčovým jádrem při předzpracování zvukové informace v rámci přesné lokalizace zdroje zvuku a analýze komplexních zvuků (Grothe, 2003). Z hlediska buněčné hustoty je MNTB nejkompaktnějším jádrem ze SOC. Obsahuje několik typů neuronálních buněk ležících mezi nervovými vlákny trapézovitého tělesa. Nejvíce zastoupené jsou hlavní neurony. Dále zde nalézáme hvězdčité buňky a buňky protáhlé (Morest, 1968b; Willard and Ryugo, 1983; Kuwabara and Zook, 1991). Na synapsích MNTB neuronů se excitační vstupy přicházející z kontralaterálního anteroventrálního kochleárního jádra (AVCN) přepojují na inhibiční (glycinergní) výstup pokračující ke svým inervačním cílům. Silné myelinizované axony hlavních neuronů opouštějící MNTB projikují především do LSO, ale i do MSO, dorsomediálního a ventromediálního jádra

paraolivy a jader laterálního lemnisku (Banks and Smith, 1992; Sommer et al., 1993; Tsuchitani, 1994; Smith et al., 1998).



**Obr. 2. Přehled přenosu signálu mozkovým kmenem potkana s důrazem na MNTB**

Vlevo nahoře, Pohled na mozek potkana s naznačenou rovinou řezu. Dole, Koronální řez mozkového kmene v rovině SOC. Zvukový signál detekovaný kochleou je dále zpracován v anteroventrálním kochleárním jádře (AVCN). AVCN vysílá excitační (červeně) kontralaterální projekce do MNTB. Tyto projekce tvoří obří glutamatergní zakončení zvaná Heldovy kalichy na hlavních neuronech MNTB. Z MNTB pokračuje inhibiční projekce (modře) do dalších jader mozkového kmene: ventrálního jádra trapézovitého tělesa (VNTB), mediální olivy superior (MSO), laterální olivy superior (LSO), jader superiorní paraolivy (SPN) a jader laterálního lemnisku. Aktivita MNTB je modulována inhibiční projekcí z VNTB a prostřednictvím zpětných kolaterál axonů neuronů MNTB, vlákna z VNTB a zpětné kolaterály kontaktují těla hlavních neuronů v podobě malých glycinergních zakončení. Projekce jsou typicky tonotopické. Gradient v odstínech šedé uvnitř jader vyznačuje nízkofrekvenční (světlé odstíny) až vysokofrekvenční (tmavé odstíny) tonotopickou organizaci různých jader (Borst and Soria van Hoeve, 2012).

Excitační vstupy přicházejí do MNTB převážně z globulárních keříčkových buněk (GBC). GBC jsou oválné buňky s excentricky uloženým jádrem a jedním keříčkovitým dendritem. Nalézají se v AVCN, v tzv. intersticiální oblasti, představující přechod AVCN a PVCN (posteroventrálního kochleárního jádra), která je určena větvicemi se vlákny vstupujícího sluchového nervu, a oblastech AVCN i PVCN těsně k ní přiléhajících. Jejich axony vytvářejí na hlavních neuronech synapse představující svou stavbou u savců ojedinělý fenomén. Jedná se o obří axosomatická zakončení nazývaná Heldovy kalichy (Held, 1893; Willard and Ryugo, 1983; Spirou et al., 1990).

Kromě masivní excitační inervace, dostávají hlavní neurony ještě další excitační vstupy. Jedná se o menší excitační zakončení, která patrně z části představují kolaterály kaliceálních vstupů (Hamann et al., 2003; Rodríguez-Contreras et al., 2008). Většina této inervace končí na tělech a proximálních dendritech hlavních neuronů. Část inhibičních vláken vycházejících z hlavních neuronů tvoří zpětné kolaterály, které inervují těla hlavních neuronů a vytvářejí zde malá inhibiční zakončení (Dondzillo et al., 2016). Za další zdroj inhibičních zakončení se považuje ipsilaterální ventrální jádro trapézovitého tělesa (Albrecht et al., 2014). Z těchto zakončení se uvolňují inhibiční neuropřenašeče (GABA/glycin), které se účastní synaptického přenosu přes glycinové a GABA<sub>A</sub> receptory (Smith et al., 1998). GABA- a glycinergní systémy v MNTB představují efektivní inhibiční systém schopný rychlé modulace excitačního přenosu (Awatramani et al., 2004).

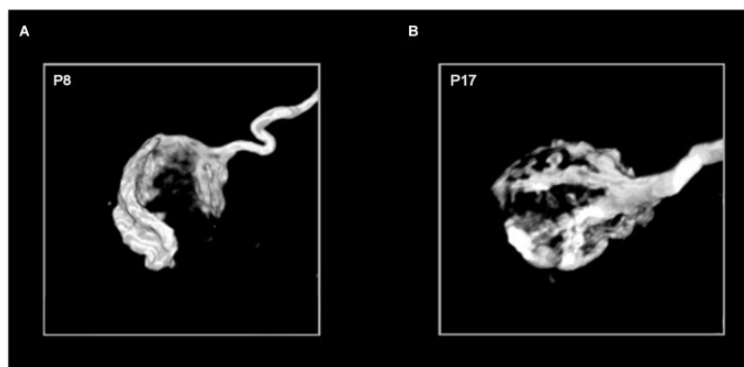
### **1.3.1. Vývoj a struktura Heldovy synapse**

Heldův kalich byl poprvé popsán na konci devatenáctého století Hansem Heldem za použití nově objevené Golgiho metody histologického značení (Held, 1893). Svojí rozsáhlostí zaujal řadu neuroanatomů, kteří popsali jeho základní anatomii. Zhruba o století později došlo k jeho znovu objevení jako tkáňového preparátu vhodného pro studium synaptického přenosu technikou terčíkového zámku (Forsythe, 1994). Heldova synapse se skládá z presynaptického Heldova kalichu a postsynaptického těla hlavního neuronu.

U hlodavců se postsynaptické neurony MNTB objevují mezi 12. až 14. dnem intrauterinního vývoje. Hlavní neurony dospělých zvířat jsou kulaté či oválné (velikost ~20 μm) s excentricky uloženým jádrem a 1-2 nepříliš rozvětvenými dendrity v neustáleném směru. Většina z nich končí v rámci MNTB (Morest, 1968b; Kuwabara and Zook, 1991; Smith et al., 1998). Během časného postnatálního vývoje dochází k postupnému formování a zrání nervového zakončení Heldova kalichu (Obr. 3). K dramatickým změnám dochází zejména v období kolem nástupu slyšení. Presynaptické axony budoucí Heldovy synapse postupně



prorůstají z GBC kontralaterálního AVCN přes středovou osu mozkového kmene a kolem 2.-3. postnatálního dne se objevuje první náznak kalichu tzv. protokalich (Hoffpauir et al., 2010). GBC neurony juvenilních zvířat mají mnoho kolaterál, které kontaktují postsynaptické neurony a naopak jeden hlavní neuron může být obsazen až několika nezralými kalichy. Následně dochází k postupnému zániku některých kontaktů. Drtivá většina hlavních neuronů MNTB u mladých dospělých zvířat je již v kontaktu pouze s jednou GBC. Vyzrálé synaptické spojení je rozsáhlé, má prstovité výběžky a je omezeno prakticky pouze na tělo hlavního neuronu (Morest, 1968a; Hoffpauir et al., 2006; Ford et al., 2009).



**Obr. 3. Postnatální vývoj Heldova kalichu**

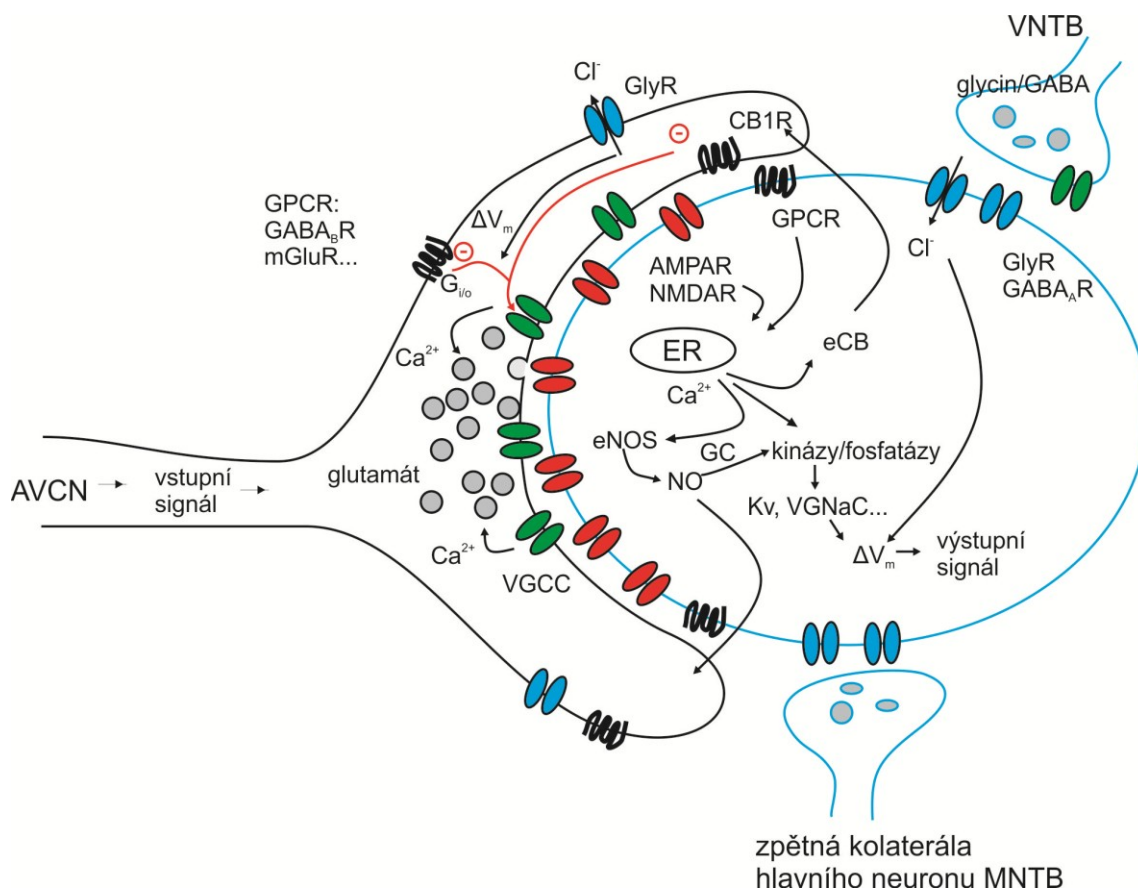
Obrázky trojrozměrné struktury kalichů zvířat starých 8, (A) a 17, (B) dní. Kalichy byly naplněny biotinylovaným dextran aminem a vizualizovány fluorescenčně. Průměr kalichů je 15-20  $\mu\text{m}$  (Wang and Augustine, 2014).

Kromě morfologických změn prodělává Heldův kalich i změny v elektrických a molekulárně biologických vlastnostech presynaptického a postsynaptického neuronu. Např. dramaticky vzrůstá velikost kaliceálních excitačních proudů (Chuhma and Ohmori, 1998; Hoffpauir et al., 2006), zatímco klesá vstupní odpor hlavního neuronu (Hoffpauir et al., 2010; Rusu and Borst, 2011). Tyto funkční změny vedou k upřednostnění příspěvku Heldovy synapse vůči dalším synaptickým kontaktům hlavního neuronu při udávání výstupní frekvence akčních potenciálů (AP) a podporuje její funkci relé v přesném převodu excitace na inhibici.

### 1.3.2. Vlastnosti synaptického přenosu v MNTB

Glutamátergní synaptický přenos na Heldově synapsi se vyznačuje velkou rychlostí a spolehlivostí až do vysokých frekvencí presynaptických AP. Toto je umožněno speciálními vlastnostmi, mezi něž patří velké množství uvolňovacích míst s poměrně nízkou pravděpodobností uvolnění (Meyer et al., 2001; Sätzler et al., 2002; Taschenberger et al., 2002), velké množství váčků připravených k okamžitému uvolnění (Schneggenburger et al., 1999;

Sakaba and Neher, 2001; Sun and Wu, 2001; Wölfel et al., 2007)), či přítomnost postsynaptických AMPA receptorů s rychlou kinetikou (Caicedo and Eybalin, 1999; Lawrence and Trussell, 2000; Taschenberger and von Gersdorff, 2000; Yang et al., 2011).



#### Obr. 4. Synaptický přenos v MNTB a jeho modulace

Upraveno podle Kopp- Scheinplug et al, 2011; Albrecht et al, 2014; Dondzillo et al, 2016. Popis v textu kapitoly 1.3.2.: Vlastnosti synaptického přenosu v MNTB. (AMPA receptor pro  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionovou kyselinu, CB1R, kanabinoidní receptor typu 1, eCB-endogenní kanabinoid, eNOS endoteliální syntáza oxidu dusnatého, GABA<sub>A</sub>-receptor pro  $\gamma$ -amino máselnou kyselinu typ A, GC-guanylát cykláza, GlyR glycinový receptor, GPCR- receptor spřažený s trimerním G-proteinem, Kv-napětově závislý draslíkový kanál, mGluR-metabotropní glutamátový receptor, NMDAR-N- methyl-D aspartátový receptor, VGCC- napětově závislý vápníkový kanál, VGNaC-napětově závislý sodíkový kanál)

Výlev glutamátu z Heldova kalichu je vyvolán zvýšením koncentrace vápníku v oblasti presynaptických uvolňovacích míst (Barnes-Davies and Forsythe, 1995; Borst and Sakmann, 1996). Příchod presynaptického AP aktivuje napětově závislé vápníkové kanály (VGCC)

především typu P/Q (Iwasaki and Takahashi, 1998).  $\text{Ca}^{2+}$  ionty následně spouští výlev váčků s neuropřenašečem. Tento proces je posilován aktivací presynaptických glycinových receptorů (Turecek and Trussell, 2001). Presynaptické  $\text{GABA}_B$ , metabotropní glutamátové receptory, noradrenergní receptory či endokanabinoidní receptory naopak aktivací G-proteinové signalizace inhibují VGCC, čímž výlev glutamátu snižují (Barnes-Davies and Forsythe, 1995; Takahashi et al., 1996; Isaacson, 1998; Leão and Von Gersdorff, 2002; Kushmerick et al., 2004). Glutamát postsynapticky aktivuje AMPA, NMDA (NMDA receptory pouze u mladých zvířat) (Taschenberger and von Gersdorff, 2000; Futai et al., 2001) i metabotropní glutamátové receptory (Kushmerick et al., 2004). Aktivace ionotropních glutamátových receptorů vede ke vstupu sodných a vápenatých iontů do postsynaptického hlavního neuronu, k jeho depolarizaci a vzniku postsynaptického AP. Postsynaptické glutamatergní proudy rovněž stimulují aktivaci intracelulárních signálních kaskád ovlivňujících v konečném důsledku produkci NO či různé iontové vodivosti (napětím-řízené  $\text{K}^+$  kanály (Kv) a jiné.) (Obr. 4)

Synaptický přenos na Heldově synapsi podléhá inhibiční modulaci (Adams and Mugnaini, 1990). Význam inhibiční modulační vzrůstá s věkem a na hranici dospělosti je rychlost a síla inhibičního synaptického přenosu podobná jako u přenosu excitačního (Awatramani et al., 2004, 2005a). Aktivita inhibičního synaptického systému doposud nebyla spolehlivě prokázána v *in vivo* záznamech z MNTB. Na přítomnost jejího modulačního vlivu je usuzováno například z pozorování selhání v excitačním synaptickém přenosu. Další důkazy plynou z odlišností v načasování presynaptických a postsynaptických odpovědí, které je možno vysvětlit modelem, v němž je aktivita hlavního neuronu MNTB výsledkem integrace aktivity excitačních a inhibičních synaptických vstupů (Kopp-Scheinpflug et al., 2003; Lorteije et al., 2009).

### **1.3.3. Odpověď hlavních neuronů MNTB na zvuk**

Vzhledem k dominantnímu kaliceálnímu vstupu jsou MNTB neurony aktivovány v zásadě pouze kontralaterálními zvuky (Guinan et al., 1972; Tsuchitani, 1994). Hlavní neurony MNTB jsou inervovány silnými myelinizovanými vlákny, která zajišťují vysokou rychlost vedení vzruchů a velice krátké latence odpovědí MNTB neuronů na zvukovou stimulaci. Tak jako ostatní jádra sluchové dráhy je i MNTB tonotopicky organizováno, přičemž buňky reagující na nízké frekvence jsou umístěny laterálně, zatímco buňky odpovídající na vysoké frekvence zvuku jsou lokalizovány mediálně. Buňky odpovídající na vysoké frekvence jsou v tomto jádře hojněji zastoupeny. Hlavní neurony MNTB se vyznačují různou mírou spontánní aktivity (od jednoho do více než 100 Hz). Zvuková stimulace pak vyvolá výraznou odpověď

hlavních neuronů (průměrná frekvence aktivity kolem 300 Hz). Ta do značné míry připomíná aktivitu GBC. Odpovědi MNTB neuronů jsou tedy tzv. „primary like“ (sledují odpovědi GBC) a to při nízkých intenzitách stimulace a při vyšších frekvencích akustické stimulace jsou nejčastěji „primary like with notch“ (sledují odpovědi GBC, ukončení stimulace vede ke krátkému ustání aktivity hlavního neuronu) či „onset“ následované nižší udržovanou aktivitou (reagují zvýšením aktivity na počátek stimulace (Smith et al., 1991; Sommer et al., 1993; Smith et al., 1998; Kopp-Scheinpflug et al., 2008; Lorteije et al., 2009).

## 1.4. Glycinové receptory

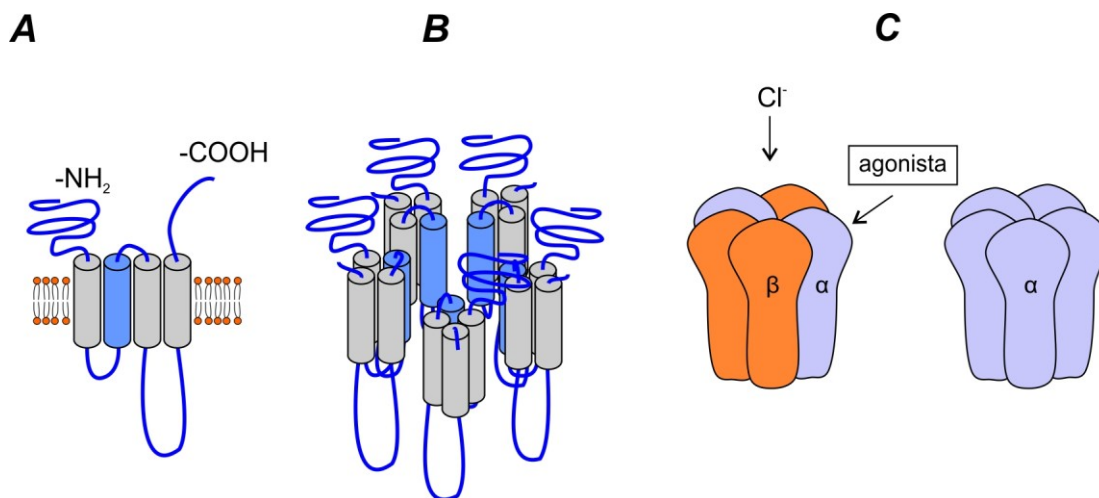
Glycin je hlavním inhibičním přenašečem v míše, mozgovém kmeni a sítnici. Roku 1981 byly skupinou H. Betze izolovány receptory aktivované tímto neuropřenašečem (Pfeiffer and Betz, 1981). Jedná se o ionotropní glycinové receptory (GlyR) patřící do tzv. Cys-loop rodiny receptorů spolu s nikotinovými acetylcholinovými receptory, ionotropními receptory pro  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu typu A a C a ionotropním serotoninovým receptorem typu 3. Vazba glycinu na postsynaptické GlyR vede k otevření kanálu propustného pro  $\text{Cl}^-$  a  $\text{HCO}_3^-$  ionty. Chloridové ionty zpravidla vstupují do buňky a vzniká inhibiční postsynaptický potenciál. GlyR se vyskytují i presynapticky, kde modulují uvolňování neuropřenašeče (Grenningloh et al., 1987).

### 1.4.1. Podjednotkové složení a struktura GlyR

Glycinové receptory jsou pentamery složené z podjednotek  $\alpha$  (48kDa) a  $\beta$  (58kDa). Molekulárně biologické klonovací studie našly čtyři geny kódující podjednotku  $\alpha$  a jeden gen pro podjednotku  $\beta$ . Izoformy podjednotky  $\alpha$  vykazují vysokou sekvenční homologii (80-90%). Podjednotka  $\beta$  se pak s nimi shoduje přibližně ve 47% aminokyselinové sekvence (Grenningloh et al., 1987; Grenningloh et al., 1990a; Grenningloh et al., 1990b; Kuhse et al., 1990; Matzenbach et al., 1994). Přítomnost sestřihových variant u podjednotek  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  a  $\beta$  dále zvyšuje různorodost GlyR (Kuhse et al., 1991; Malosio et al., 1991b; Nikolic et al., 1998).

Každá podjednotka GlyR sestává z velké N- koncové extracelulární domény, čtyř transmembránových segmentů tvořených  $\alpha$ -šroubovicemi (TM1-TM4) a krátkého extracelulárního C-konce (Obr. 5). TM2 každé z podjednotek se podílí na tvorbě póru propustného pro anionty. Transmembránové  $\alpha$ -šroubovice jsou spojeny kličkami. Prominentní úlohu zaujímá dlouhá intracelulární klička, která spojuje TM3 a TM4 a je přístupná

intracelulárním interakcím a modulacím. Sekvenční homologie mezi podjednotkami je největší v rámci transmembránových  $\alpha$ -šroubovic a vysoce konzervovaného motivu extracelulární domény (15 aminokyselin) bohatého na disulfidické můstky (tzv. Cys loop), (Burgos et al., 2016).



**Obr. 5. Schéma struktury glycinového receptoru**

*A, Všechny podjednotky mají dlouhý extracelulární N-konec, 4 transmembránové domény a extracelulární C konec, dlouhá druhá intracelulární klička obsahuje místa přístupná intracelulárním modulacím. B, Orientace transmembránových domén při tvorbě receptoru; druhá transmembránová doména se podílí na tvorbě póru iontového kanálu. C, Glycinové receptory jsou pentamery složené z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ . Složení receptorů se mění během vývoje. Dospělou formu tvoří převážně  $\alpha\beta$  heteromery, zatímco embryonálně převažuje  $\alpha$  homomerní forma receptoru.*

Převážnou většinu nativních GlyR dospělých zvířat představují  $\alpha\beta$  heteromery,  $\alpha$  homomerní receptory se vyskytují jen omezeně (Jeong et al., 2003; Deleuze et al., 2005; Bae et al., 2016). Podjednotky jsou v heteromeru zastoupeny v poměru  $2\alpha/3\beta$  (Grudzinska et al., 2005). Oblasti kritické pro vazbu agonisty se nachází na podjednotce  $\alpha$  (Lynch, 2004; Burgos et al., 2016), ale na tvorbě vazebného místa se ale podílí i podjednotka  $\beta$  (Graham et al., 1983; Grudzinska et al., 2005). Samotná  $\beta$  podjednotka exprimovaná v heterologních expresních systémech funkční receptor netvoří. Její hlavní funkce spočívá ve specifickém shlukování postsynaptických glycinových receptorů v postsynaptické denzitě. To je umožněno pomocí interakcí mezi její intracelulární smyčkou spojující domény TM3 a TM4 a intracelulárními

proteiny. Jejím nejznámějším partnerem je cytosolický protein gephyrin, který dále interaguje se složkami cytoskeletu. Byla ukázána i interakce  $\beta$  podjednotky s Vps35 a neurobeachinem, které se účastní vnitrobuněčného transportu membránových proteinů (Grenningloh et al., 1990a; Langosch et al., 1990; Prior et al., 1992; Kneussel and Betz, 2000; Legendre, 2001; Maas et al., 2006; del Pino et al., 2011).

Glycinové receptory nalézáme na obou stranách synaptického spojení. V rámci intracelulární lokalizace byly nalezeny rozdíly v rozmístění homo- versus heteromerních receptorů. Přítomnost gephyrin vážící  $\beta$  podjednotky je rozhodujícím faktorem pro budoucí umístění GlyR. Ze současných studií vyplývá, že  $\alpha\beta$  heteromerní GlyR jsou shlukovány na postsynaptických místech. Oproti tomu GlyR sestávající se pouze z  $\alpha$  podjednotek jsou lokalizovány extrasynapticky/ presynapticky a jejich rozmístění je difúzní (Deleuze et al., 2005; Bae et al., 2016).

#### 1.4.2. Vlastnosti GlyR

Vlastnosti GlyR jsou do značné míry určeny podjednotkovým složením. To ovlivňuje jejich iontovou vodivost a kinetické vlastnosti, afinitu pro agonisty nebo antagonisty či různá alosterická modulační vazebná místa. GlyR se vyznačují několika jednotkovými vodivostními stavy.  $\alpha$  homomerní GlyR se nejčastěji otevírají do nejvyššího stavu o vodivosti  $\sim 90$  pS ( $\alpha 1$ ) nebo  $\sim 110$  pS ( $\alpha 2$  a  $\alpha 3$ ). Přítomnost  $\beta$  podjednotky eliminuje nejvyšší vodivostní stav. Heteromery pak vykazují nejvyšší pravděpodobnost otevření do vodivostního stavu s vodivostí kolem 45 pS (Takahashi et al., 1992; Bormann et al., 1993; Beato et al., 2002; Beato and Sivilotti, 2007). Podjednotkové složení ovlivňuje i kinetiku odpovědi GlyR. Rekombinantní  $\alpha 2$  homomerní receptory vykazují o jeden až dva řády pomalejší nástup glycinem vyvolané odpovědi v porovnání se synaptickými GlyR dospělých zvířat (převážně  $\alpha 1\beta$  heteromery) (Takahashi et al., 1992; Mangin et al., 2003; Betz and Laube, 2006).

Iontový kanál GlyR je tvořen TM2  $\alpha$ -šroubovicemi korespondujících podjednotek a jeho udávaný průměr je 5,2-6 Å. Předpokládá se, že obsahuje minimálně dvě vazebná místa, se kterými interagují prostupující ionty. Propustnost pro jednotlivé anionty závisí na iontových hydratačních energiích je v pořadí  $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$  (Bormann et al., 1987; Fatima-Shad and Barry, 1993).

Původní kinetický model glycinem řízeného kanálu obsahuje dva otevřené a dva uzavřené stavy. Heteromerní  $\alpha 1\beta$  GlyR obsahují dvě glycin vazebná místa. Podle něj po navázání 2 molekul glycinu na receptor dochází k otevření iontového kanálu či jeho přechodu

do desenzitizovaného stavu. Desenzitizovaný stav může dále přejít do dalšího otevřeného stavu, který je kineticky odlišný od stavu prvního (Legendre, 1998). Novější práce navrhly zpřesněný kinetický model GlyR se třemi vazebnými místy a třemi otevřenými a šesti uzavřenými stavy (Burzomato et al., 2004; Beato and Sivilotti, 2007).

Vazebné místo pro agonisty a kompetitivní antagonisty se nachází na extracelulární doméně v oblasti kontaktu mezi sousedními podjednotkami. Nejvýznamnějším endogenním agonistou glycinového receptoru je glycin. Je to vysoce selektivní agonista glycinových receptorů s rozdílnou afinitou pro receptory různého podjednotkového složení. Homo- i heteromerní GlyR jsou aktivovány několika dalšími aminokyselinovými agonisty v následujícím pořadí podle účinnosti: glycin >  $\beta$ -alanin > taurin > GABA. Do extracelulární oblasti či transmembránové oblasti GlyR se váží i sloučeniny, které alostericky modulují agonistou vyvolané odpovědi. Neurosteroidy, celková anestetika (halotan, isofluran) či ethanol zesilují odpovědi GlyR a tím tlumí činnost centrálního nervového systému. Zinečnaté kationty a endogenní kanabinoidy mohou mít potenciační i inhibiční efekt v závislosti na jejich použité koncentraci a na koncentraci přítomného glycinu či jeho agonisty. Silnou inhibici glycinem vyvolaných odpovědí vyvolává aplikace strychninu, který je účinným kompetitivním antagonistou GlyR (Laube et al., 2002; Lynch, 2004; Betz and Laube, 2006; Maksay et al., 2009). Antagonisté ionotropního serotoninového receptoru ze skupiny tropeinů mimo jiné ovlivňují funkci GlyR. Jedním z nich je ICS205,930 (tropisetron) působící jako alosterický modulátor GlyR. Zesiluje odpovědi  $\alpha\beta$  heteromerního GlyR zvýšením jeho afinity ke glycinu (Chesnoy-Marchais, 1996, 1999; Supplisson and Chesnoy-Marchais, 2000). Dalšími látkami, které selektivně ovlivňují aktivitu GlyR v závislosti na podjednotkovém složení receptoru jsou např. pikrotoxin a jeho deriváty či kyanotrifenylový borát (CTB). Nekompetitivní antagonist pikrotoxin inhibuje  $\alpha 1$  homomerní GlyR (Lynch et al., 1995). Negativně nabitý kyanotrifenylový borát blokuje póry GlyR obsahujících  $\alpha 1$  podjednotku (Rundström et al., 1994).

#### **1.4.3. Odpověď GlyR v závislosti na intracelulární koncentraci $\text{Cl}^-$**

Na rozdíl od inhibičního (hyperpolarizujícího) vlivu u dospělých neuronů, v embryonální a časně postnatální fázi vývoje funguje glycin jako depolarizační agens. Charakter odpovědi ionotropního receptoru je určen reverzním potenciálem iontů, pro které je tento kanál propustný, a jejich polaritou. Díky vysoké intracelulární koncentraci chloridových iontů v tomto období je reverzní potenciál pro  $\text{Cl}^-$  pozitivnější než klidový membránový potenciál a aktivace GlyR vede k výtoku  $\text{Cl}^-$  iontů z buňky. Toto je způsobeno zesílenou expresí  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  přenašeče (NKCC1) u časných vývojových stadií (Kandler and Friauf, 1995;

Ehrlich et al., 1999; Delpire, 2000; Owens and Kriegstein, 2002). Časná excitační funkce GlyR má svojí úlohu v synaptogenezi (Flint et al., 1998; Kirsch and Betz, 1998). Exprese  $K^+/Cl^-$  přenašeče (KCC2) ve věku kolem P12-P16 zajistí přechod neuronu na vyzrálý fenotyp (Balakrishnan et al., 2003). Činnost transportéru sníží intracelulární koncentraci chloridových iontů, posune rovnovážný potenciál pro chloridové ionty k hodnotám negativnějším než je klidový potenciál a glycinem vyvolané proudy pak mají hyperpolarizační (inhibiční) charakter (Stein and Nicoll, 2003).

#### 1.4.4. Rozmístění GlyR v nervové soustavě

Distribuce GlyR byla nejprve studována autoradiografickou metodou s použitím značeného [ $^3H$ ] strychninu. Vazebná místa pro strychnin se hojně vyskytují v míše, prodloužené míše, méně pak v oblasti Varolova mostu, hypotalamu a talamu. Téměř žádný signál však nebyl zachycen ve vyšších oddílech mozku. Zatímco v míše je distribuce vazebných míst v šedé hmotě spíše difúzní, v mozkovém kmeni jsou GlyR striktně lokalizovány do jednotlivých jader (jádra n. V, motorické jádro nervu n. XII, jádra drah zadních provazců míšních, kochleární jádra a další). Vysoká koncentrace GlyR byla nalezena i v retině (Zarbin et al., 1981; Probst et al., 1986; Pourcho, 1996). Následná imunohistochemická značení ukázala přítomnost GlyR i v mozečku a *bulbus olfactorius* (Araki et al., 1988; van den Pol and Gorcs, 1988; Takahashi et al., 1992). Početné studie prokázaly i přítomnost funkční glycinergní transmise. Glycinergergí synapse byly nalezeny v retině (Grünert and Wässle, 1993), v drahách motorických míšních reflexů (Legendre, 2001), či v míšních senzitivních drahách účastnících se zpracování bolestivých podnětů (Ahmadi et al., 2001). V jádrech mozkového kmene byla glycinergergí neurotransmise prokázána např. v sluchových jádrech mozkového kmene. V kochleárních jádrech dostávajících přímé vstupy ze sluchového nervu se GlyR vyskytují na hvězdicovitých buňkách (Ferragamo et al., 1998) a globulárních buňkách (Lim et al., 2000). V MNTB a dalších jádrech SOC jsou GlyR hojně exprimovány postsynaptickými hlavními neurony (Kotak et al., 1998; Smith et al., 2000; Awatramani et al., 2005a), ale i presynaptickými neurony, např. Heldovými kalichy (Turecek and Trussell, 2001).

#### 1.4.5. Vývojové změny v expresi a funkci GlyR a regionální distribuce izoform

Embryonální a neonatální GlyR jsou převážně  $\alpha 2$  homopentamery (Becker et al., 1988; Malosio et al., 1991a; Flint et al., 1998), zatímco typickou dospělou formu představují  $\alpha\beta$  heteromery (Lynch, 2009). V dospělém centrálním nervovém systému tedy převažují



heteromerní  $\alpha 1\beta$  GlyR, i když byla potvrzena i přítomnost GlyR heteromerů obsahujících podjednotky  $\alpha 2$ - $\alpha 4$ . Synapticky lokalizovaná  $\alpha 2$  u dospělých zvířat byla nalezena v retině, *bulbus olfactorius*, ale i v míše, mozkovém kmeni a středním mozku (Weltzien et al., 2012). Exprese  $\alpha 3$  podjednotky byla prokázána v retině, čichovém bulbu, v míše, mozečku, (Malosio et al., 1991a) nebo v senzorickém jádře trojklanného nervu (Bae et al., 2016). Podjednotka  $\alpha 4$  je zřejmě ve větší míře přítomna na amakrinních buňkách retiny (Wässle et al., 2009).

U hlodavců je exprese  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  a  $\beta$  podjednotek zahájena perinatálně. Během postnatálního vývoje se jejich hladiny postupně zvyšují, zatímco exprese  $\alpha 2$  podjednotky klesá a během několika týdnů dosahuje bazální hladiny. Vývojová změna z  $\alpha 2$  na  $\alpha 1\beta$  je dokončena kolem 20. dne postnatálního vývoje (Malosio et al., 1991a; Singer et al., 1998). Navzdory preferenčnímu  $\alpha\beta$  heteromernímu fenotypu GlyR dospělých zvířat, byla ve zralém centrálním nervovém systému prokázána i sporadická přítomnost homomerních receptorů. Nacházejí se v senzorickém jádře trojklanného nervu (Bae et al., 2016), či v supraoptickém jádře hypotalamu (Deleuze et al., 2005).

Pomalá kinetika odpovědi  $\alpha 2$  homomerních GlyR naznačuje, že tyto receptory jsou přizpůsobeny pomalé aktivaci nesynaptickým parakrinním výlevem agonisty, k němuž dochází v embryonální a časně postnatální fázi vývoje. Předpokládá se, že důsledkem jejich aktivace je depolarizace neuronálních buněk a vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, nutný pro vývojové změny zajišťující zrání glycinergních synapsí (Flint et al., 1998; Kirsch and Betz, 1998). Oproti tomu rychlá aktivační kinetika a kratší doba otevření  $\alpha 1\beta$  heteromerních receptorů vyhovuje jejich funkci ve fázickém inhibičním synaptickém přenosu ve zralých nervových strukturách (Takahashi et al., 1992; Mangin et al., 2003; Takahashi, 2005; Betz and Laube, 2006).

#### 1.4.6. Patologické stavy spojené s GlyR

Porucha v glycinergní transmissi je nejčastěji spojována s dědičnou chorobou zvanou hyperekplexie (startle disease) (Andermann and Andermann, 1988; Rajendra and Schofield, 1995). Projevuje se přehnanou úlekovou reakcí na neočekávané stimuly (hlavně sluchové a taktilní). Úlekovou reakci často doprovází přechodná, ale celková svalová strnulost vedoucí k nechráněnému pádu a zranění. Příčinou hyperekplexie je dědičná mutace, projevující se snížením povrchové exprese GlyR a změnou jejich kinetiky, což vede k redukci amplitudy glycinem evokovaných proudů. Nejčastěji zaznamenané jsou autozomálně dominantní mutace R271L či R271Q na  $\alpha 1$  podjednotce GlyR (Shiang et al., 1993), ale i mutace v genu kódujícím

$\beta$  podjednotku, gefyryn či glycinový přenašeč vedou k patologickému fenotypu (Rees et al., 2002; Rees et al., 2003; Davies et al., 2010).

Nedávné studie naznačují, že i další podjednotky GlyR mohou být zahrnuty v patologických procesech. Kupříkladu v *substantia gelatinosa* zadního rohu míšního bylo ukázáno, že zablokování aktivity GlyR obsahujících  $\alpha 3$  podjednotku je zapojeno v mechanismech senzitivace při vzniku chronické bolesti způsobené dlouhodobým zánětem. GlyR obsahující  $\alpha 3$  podjednotku se nacházejí na dendritech a tělech projekčních neuronů, které jsou v kontaktu s primárními nociceptními vlákny. Mechanismus zahrnuje prostaglandinem  $E_2$  zprostředkovanou aktivaci protein kinázy A a fosforylaci GlyR. Snížení aktivity fosforylovaných GlyR na projekčních neuronech způsobí vzestup vstupního odporu membrány, zvýšení pravděpodobnosti vzniku nadprahových AP v projekčních neuronech a umožní tak zesílení signálu přenášeného do vyšších oblastí centrálního nervového systému (Harvey et al., 2004).

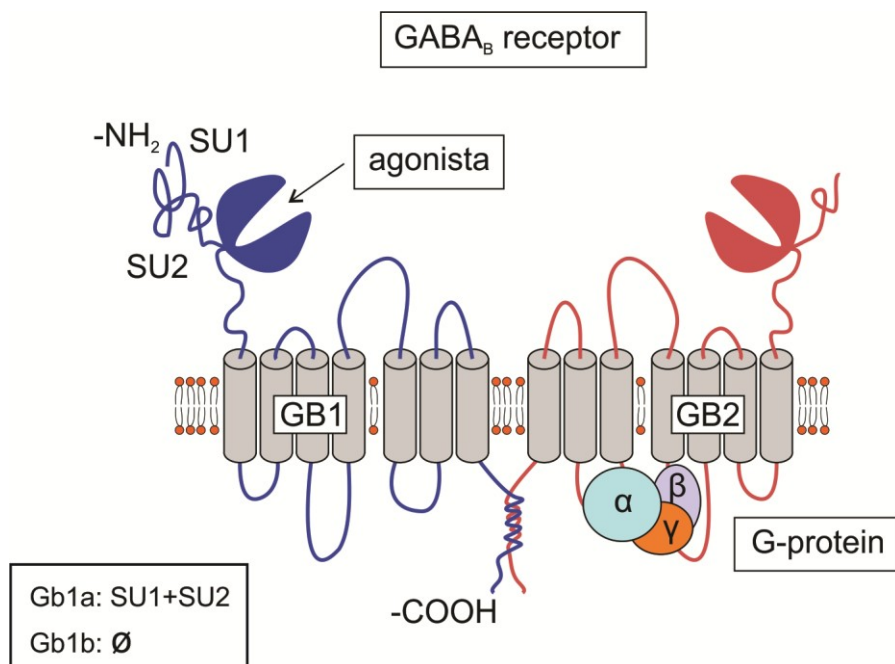
## 1.5. GABA receptory

GABA ( $\gamma$ -aminomáselná kyselina) je hlavní inhibiční neuropřenašeč v centrálním nervovém systému obratlovců. Podle typu buněčné odpovědi byly GABA receptory rozděleny na ionotropní a metabotropní. GABA<sub>A</sub> a GABA<sub>C</sub> receptory jsou iontovými kanály z rodiny nikotinového acetylcholinového receptoru (Cys-loop family) a GABA<sub>B</sub> receptory jsou receptory metabotropní, spřažené s heterotrimerními G-proteiny (Misgeld et al., 1995). GABA<sub>B</sub> receptory patří spolu s metabotropními glutamátovými receptory, receptorem citlivým na vápník, 5HT<sub>3</sub> serotoninovým receptorem, receptory na sladké, feromonovými receptory a dalšími do třetí rodiny receptorů spřažených s G-proteiny.

### 1.5.1. Struktura GABA<sub>B</sub> receptorů

GABA<sub>B</sub> receptor je heterodimer složený z podjednotek GB1 a GB2 (Kaupmann et al., 1997; Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998b; White et al., 1998) (Obr. 6). Přítomnost obou podjednotek v oligomeru je nutná pro funkčnost GABA<sub>B</sub> receptoru. Podjednotky plní odlišné funkce. GB1 váže agonistu, zatímco podjednotka GB2 je zodpovědná za interakci s G-proteiny. Podjednotky GB1 a GB2 vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci. Pro každou z nich byla nalezena cDNA pro několik sestřihových variant. Některé potenciální sestřihové varianty však obsahují předčasné stop kodony, či zvláštní sestřihová místa (např. uvnitř membránových segmentů) a jejich exprese v organismu je diskutabilní. Přímé důkazy ukazují

na majoritní expresi tří typů podjednotek  $GABA_B$  receptoru a to dvou sestříhových variant podjednotky GB1 (GB1a a GB1b) a jedné varianty podjednotky GB2 (Billinton et al., 2001).



**Obr. 6. Schématické znázornění struktury  $GABA_B$  receptoru**

$GABA_B$  je heteromer složený z podjednotek GB1 a GB2. Každá z podjednotek  $GABA_B$  receptoru má velkou N-koncovou doménu, 7 transmembránových  $\alpha$ -šroubovic spojených kličkami a intracelulární C-konec. Podjednotka GB1 nese vazebné místo pro agonistu v N-koncové doméně a podjednotka GB2 je nezbytná pro aktivaci G-proteinu. Na interakci s G-proteinem se podílejí intracelulární kličky. Podjednotka GB1 má dvě varianty, GB1a a GB1b, lišící se přítomností tzv. sushi domény v N koncové oblasti.

GB1a a GB1b varianty vznikají alternativním sestřihem jednoho genu. Sestřih probíhá v rámci N-koncové domény. Prvních 18 aminokyselinových zbytků GB1b varianty je u varianty GB1a nahrazeno 147 jinými aminokyselinovými zbytky. GB1a specifická oblast se skládá ze dvou kopií krátkých konsenzus sekvencí (short consensus repeats) nazývaných také SU1, SU2 (sushi repeats) (Hawrot et al., 1998). Tyto domény jsou zodpovědné za cílený transport GB1a/GB2 dimeru do glutamatergních nervových zakončení (Biermann et al., 2010). Sestříhové varianty GB1 podjednotky mají stejné farmakologické vlastnosti. Na vazbě agonisty se totiž podílí pouze sekvence společná oběma sestříhovým variantám. Varianta GB1a má 973

aminokyselin a varianta GB1b 844 aminokyselin, jedná se tedy o poměrně velké proteiny v rámci rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Ve struktuře vyniká zejména rozsáhlá extracelulární ligand-vazebná doména, což je společná vlastnost zástupců třetí rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Doménu tvoří dva laloky, které v nepřítomnosti ligandu neustále kolísají mezi stavem otevřeným (laloky jsou od sebe oddáleny) a zavřeným (laloky jsou přiblíženy). Role ligandu spočívá ve stabilizaci uzavřené konformace. Konformační změna, při které se oba laloky semknou k sobě a uvězní ligand uvnitř, byla nazvána podle masožravé rostliny *Venus's-flytrap mechanism*, a je klíčová pro aktivaci receptoru (Galvez et al., 2000; Kunishima et al., 2000). Přítomnost ligand vazebné domény podjednotky GB2 není nezbytná pro aktivaci GABA<sub>B</sub> receptoru, neboť se zdá, že neváže žádný přirozený ligand GABA<sub>B</sub> receptoru (Kniazeff et al., 2002). Její nepřítomnost však vede ke snížení afinity pro agonistu (nikoli však pro antagonistu) u podjednotky GB1 (Galvez et al., 2001; Liu et al., 2004).

Za ligand-vazebnou doménou následuje transmembránová oblast tvořená sedmi hydrofobními  $\alpha$ -šroubovicemi. Tato je zodpovědná za vazbu a aktivaci G-proteinu, především pomocí druhé (i2) a třetí (i3) intracelulární klíčky GB2. Aminokyselinová sekvence i3 je velmi konzervovaná a umožňuje receptoru vázat G-protein, zatímco sekvence i2 je delší a variabilnější a zodpovídá za specifitu interakce (Gomez et al., 1996; Francesconi and Duvoisin, 1998; Havlickova et al., 2002; Havlickova et al., 2003).

Každá podjednotka GABA<sub>B</sub> receptoru je zakončena C-koncovou intracelulární oblastí. Podjednotka GB1 obsahuje v C-koncové oblasti sekvenci Arg-Ser-Arg-Arg, která slouží jako signál pro její zadržení v endoplasmatickém retikulu. Retenční signál je inhibován za stavu, kdy jsou C-konce GB1 a GB2 vzájemně ovinuty a tvoří tzv. *coiled-coil* strukturu (Margeta-Mitrovic et al., 2000; Pagano et al., 2001). To umožňuje uvolnění heteromeru z endoplazmatického retikula a jeho transport do plazmatické membrány (Grünwald et al., 2002). Pro plnou funkčnost receptorového heteromeru jsou však důležité i interakce v oblasti membránových domén a samotná heterodimerizace (Galvez et al., 2001; Havlickova et al., 2002).

### 1.5.2. Rozmístění GABA<sub>B</sub> receptorů v centrálním nervovém systému

GABA<sub>B</sub> receptory se vyznačují hojným výskytem v centrální nervové soustavě. Byly nalezeny v mozkové kůře, hipokampu, talamu, Purkyňových a granulárních buňkách mozečku, mozkovém kmeni i v gangliích zadních kořenů míšních. Vyskytují se na pre- i postsynaptických částech centrálních synapsí. (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998a; Kulik et al., 2002; Kulik et al., 2003). Presynaptické GABA<sub>B</sub> auto- a heteroreceptory se často nacházejí při okrajích

aktivních zón. Postsynaptické GABA<sub>B</sub> receptory byly lokalizovány na hlavních větvích dendritů i na extrasynaptických částech dendritických trnů (Kulik et al., 2003; Guetg et al., 2009).

S použitím mutantních myší s vyřazenými geny pro expresi jednotlivých sestřihových variant GB1 byly nalezeny odlišnosti v jejich lokalizaci a distribuci a s nimi související rozdíly ve funkci v rámci centrálního nervového systému. Ukazuje se, že v hipokampu je GB1a podjednotka preferenčně zastoupena v presynaptických GABA<sub>B</sub> heteroreceptorech na glutamatergních terminálech, zatímco GB1b podjednotka se vyskytuje na postsynaptických buňkách. Na inhibičních zakončeních tato rozdílná distribuce pozorována nebyla (Vigot et al., 2006; Guetg et al., 2009). Přednostní lokalizace GB1a na excitačních glutamatergních zakončeních byla pozorována také na některých kotikotalamických zakončeních či kortikálních projekcích do amygdaly (Shaban et al., 2006; Ulrich et al., 2007).

### **1.5.3. Látky ovlivňující aktivitu GABA<sub>B</sub> receptorů**

Přirozeným ligandem GABA<sub>B</sub> receptoru je  $\gamma$ -amino máselná kyselina (GABA). Nejznámějším a nejpoužívanějším exogenním agonistou je baclofen (Lioresal), (Hill and Bowery, 1981; Bowery, 1993). Baclofen funguje jako centrální myorelaxans. Užívá se předně ke zmírnění spastických příznaků po zraněních centrálního nervového systému či při roztroušené skleróze (Lewis and Mueller, 1993; Stampacchia et al., 2016). Na rozdíl od parciálního agonisty GHB ( $\gamma$ -hydroxymáselná kyselina), nevede užívání baclofenu k hedonistickým prožitkům a vzniku závislosti. Podobně jako GHB má však baclofen sedační a anxiolytické účinky. Dalším velmi účinným agonistou GABA<sub>B</sub> je SKF97541 (Seabrook et al., 1990). K částečným agonistům patří kromě GHB např. i CGP47656. Pozitivními alosterickými modulátory GABA<sub>B</sub> receptoru jsou CGP7930, CGP13501 a rac BHFF (Urwyler et al., 2001; Malherbe et al., 2008). Kompetitivními antagonisty jsou např. analog baclofenu phaclofen (Kerr et al., 1987), experimentálně hojně využívaný vysoko afinitní antagonist CGP54626, či 2-OH saclofen a CGP35348 (Brugger et al., 1993; Bon and Galvan, 1996).

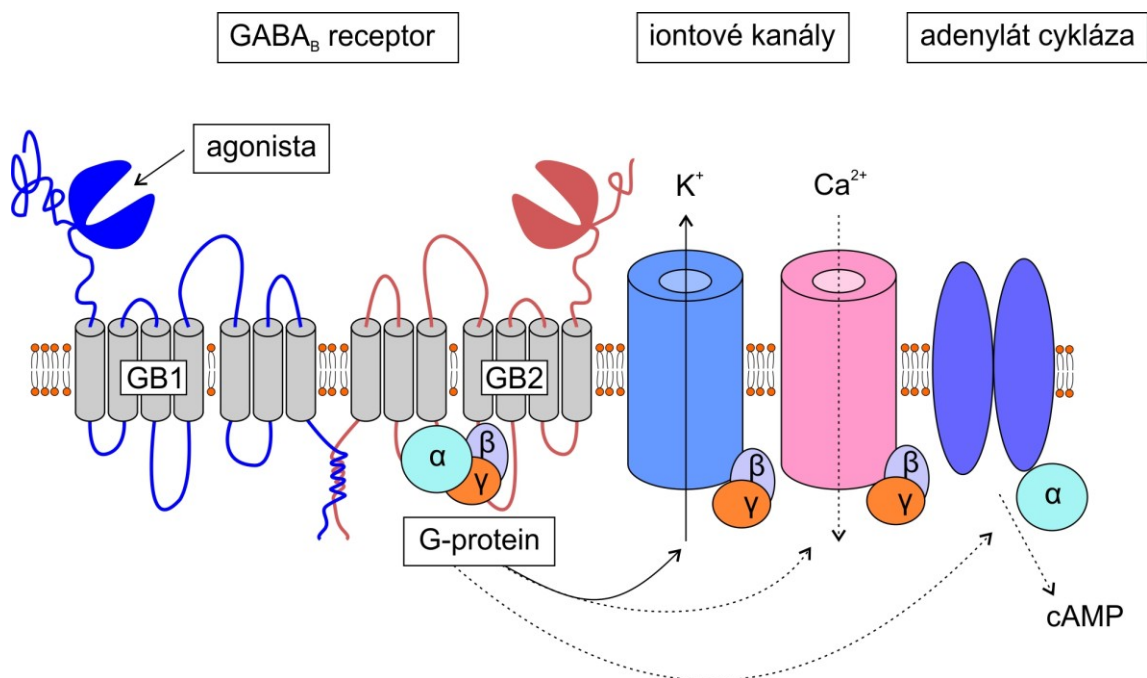
### **1.5.4. Aktivace G-proteinu GABA<sub>B</sub> receptorem**

Základní funkcí receptorů spřažených s G-proteinem je kromě rozpoznání signálu i jeho transformace a přenesení dovnitř buňky. GABA<sub>B</sub> receptory ovlivňují své efekторы prostřednictvím trimerních G-proteinů složených z podjednotek G $\alpha$  a G $\beta\gamma$ . Vazba ligandu k receptoru vyvolá konformační změnu receptoru, která aktivuje G-protein tak, že spouští výměnu GDP za GTP na G $\alpha$  podjednotce a rozpad heterotrimerního komplexu na G $\alpha$ -GTP a G $\beta\gamma$  dimer. Obě části G-proteinu pak přenášejí signál dál pomocí změny aktivity efektorových

molekul a v konečném důsledku modulují fyziologické procesy buněk a tkání. Aktivace G-proteinu je časově omezená.  $G\alpha$ -podjednotka má vnitřní hydrolázovou aktivitu, která během několika sekund přemění GTP na GDP. To vede k oddělení  $G\alpha$ -podjednotky od efektorového proteinu a jejímu opětovnému spojení s  $G\beta\gamma$ -dimerem v neaktivní heterotrimerní komplex (Lodish et al., 2000).

#### **1.5.5. Fyziologická role $GABA_B$ receptorů v centrálním nervovém systému**

Aktivace  $GABA_B$  vede k široké škále buněčných odpovědí. Za účelem objasnění mechanismů heterogenity  $GABA_B$  odpovědí v přirozených systémech byly provedeny rozsáhlé elektrofyziologické a farmakologické studie v hipokampu, ale i v kortexu a dalších oblastech centrálního nervového systému. Nejdříve identifikovaným efektem  $G\alpha$  podjednotky byla adenylát cykláza. Aktivace  $GABA_B$  receptoru stimuluje  $G_{i/o}\alpha$  podjednotku, která aktivitu adenylát cyklázy inhibuje, a to jak na postsynaptické úrovni (Xu and Wojcik, 1986), tak i v nervových zakončeních (Sakaba and Neher, 2003). Výsledkem je snížení buněčné excitability. Nejznámějšími presynaptickými efekty  $GABA_B$  receptoru jsou napětově závislé vápníkové kanály (VGCC) typu N a P/Q. Interakce aktivovaných  $G\beta\gamma$  s těmito kanály vede k jejich uzavření a snížení výlevu neuropřenašeče z presynaptického zakončení (Tatebayashi and Ogata, 1992).  $GABA_B$  receptory mohou působit jako autoreceptory na  $GABA$ ergích zakončeních i jako heteroreceptory na zakončeních glutamatergických, dopaminergických a jiných. Dle typu přenašeče v nervovém zakončení má pak aktivace  $GABA_B$  receptoru excitační či inhibiční efekt na postsynaptické buňce (Isaacson, 1998; Takahashi et al., 1998; Bussi eres and El Manira, 1999; Barral et al., 2000). Kromě ovlivňování hladin vápníku v presynaptickém zakončení může  $GABA_B$  receptor ovlivnit v ılev neuropřenašečů i p ımo zpomalením recyklace synaptických věků zp ısobem závislým na cyklickém adenosinmonofosfátu (Sakaba and Neher, 2003). Významným postsynaptickým efektem  $GABA_B$  receptoru jsou též dovn ıtr  usm r uj ıc ı draslíkové kanály typu Kir3 (GIRK) (L scher et al., 1997; Kaupmann et al., 1998a). Jejich aktivace  $GABA_B$  receptorem na postsynaptick  straně vyvolá pom le postsynaptick  proudy působící hyperpolarizaci neuronu a zkratování postsynaptických excitačních proud  . Pom rn  nedávno byla objevena i presynaptick  modulace Kir3  $GABA_B$  receptorem (Ladera et al., 2008).



**Obr. 7. Efektory GABA<sub>B</sub> receptoru**

GABA<sub>B</sub> receptor aktivuje trimerní G-protein. Po vazbě GTP se G-protein rozpadá na  $G_{i/o}\alpha$  inhibující adenylát cyklázu a  $G\beta\gamma$  dimer, jehož hlavními efekty jsou dovnitř usměrněné draslíkové kanály (GIRK) a napětově závislé vápníkové kanály (VGCC). GABA<sub>B</sub> receptor aktivuje GIRK a inhibuje VGCC.

Aktivace GABA<sub>B</sub> receptoru neovlivňuje pouze aktuální synaptickou aktivitu, ale moduluje i dlouhodobé změny v synaptické síle. Např. bylo ukázáno, že omezení postsynaptické inhibice aktivací GABA<sub>B</sub> autoreceptorů vede k facilitaci LTP (Davies and Collingridge, 1996). Na druhé straně bylo zjištěno, že presynaptické GABA<sub>B</sub> heteroreceptory obsahující GB1a podjednotku způsobují snížení výlevu glutamátu, což ovlivňuje navození LTP na hipokampálních synapsích. (Vigot et al., 2006).

Nedávno bylo ukázáno, že rozmanitost odpovědí GABA<sub>B</sub> receptorů zvyšují zástupci velmi rozsáhlé rodiny cytoplazmatických proteinů obsahujících tzv. tetramerizační doménu draslíkových kanálů, KCTD proteiny. Bylo zjištěno, že GABA<sub>B</sub> receptory specificky interagují s KCTD proteiny 8, 12, 12b a 16. Díky přítomnosti tetramerizační domény vznikají oligomery složené ze čtyř KCTD proteinů, z nichž každý interaguje s GABA<sub>B</sub> receptorem. Místem interakce je tyrosin 902 na C-konci podjednotky GB2. KCTD proteiny jsou na GABA<sub>B</sub> receptor konstitutivně navázány a zvyšují zjevnou afinitu GABA<sub>B</sub> receptoru. KCTD mají rovněž schopnost vazby k aktivovaným  $G\beta\gamma$ , což významně ovlivňuje kinetiku GABA<sub>B</sub> aktivovaných

K<sup>+</sup> proudů. (Schwenk et al., 2010; Gassmann and Bettler, 2012; Turecek et al., 2014; Fritzius et al., 2017).

## 1.6. Vápníkem aktivované draslíkové kanály

Vápníkem aktivované draslíkové kanály jsou fylogeneticky i strukturně podobné napětově závislým draslíkovým kanálům. Dělí se do tří skupin: BK, IK a SK kanály. BK vykazují vysokou vodivost (100-300 pS) a napětovou citlivost. Účastní se repolarizace AP, odpovídají za rychlou složku posthyperpolarizace následující AP (Yang et al., 2015). IK se vyznačují střední vodivostí (25-100 pS) a přispívají ke vzniku pomalé posthyperpolarizační fáze (AHP) (délka trvání v řádu sekund). SK kanály se otevírají do nízkovodivostních stavů (10-14 pS) a zodpovídají za tzv. střední fázi AHP (mAHP), (délka trvání desítky ms).

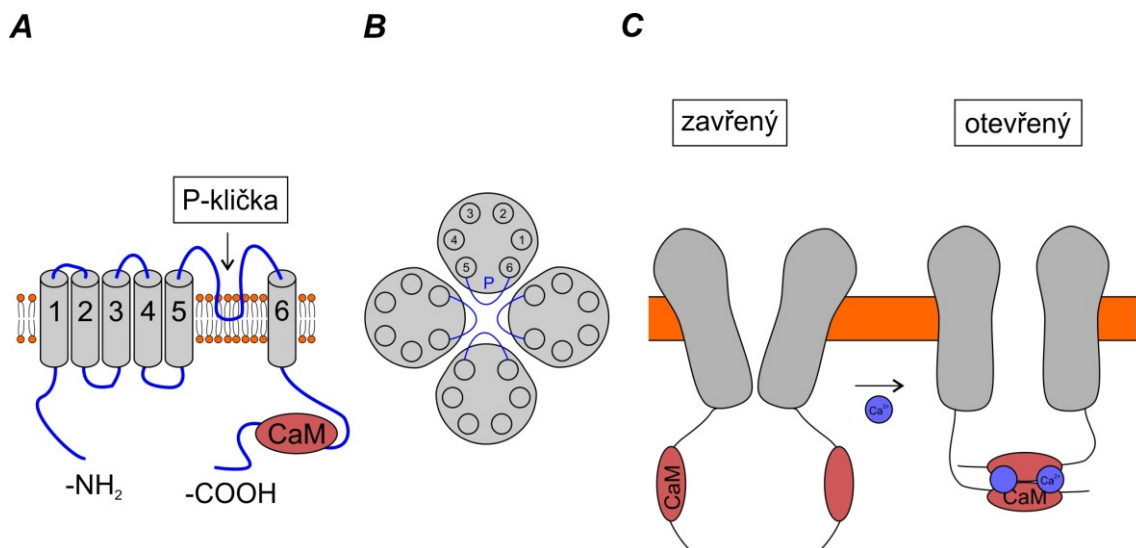
### 1.6.1. Struktura SK kanálů

V centrálním nervovém systému byly nalezeny tři různé geny kódující podjednotky SK kanálů, SK1 (K<sub>Ca</sub> 2.1), SK2 (K<sub>Ca</sub> 2.2) a SK3 (K<sub>Ca</sub> 2.3) (Köhler et al., 1996). Podjednotky se podílejí na tvorbě oligomerních komplexů utvářejících funkční SK kanál. Ten je složen ze čtyř SK podjednotek, z nichž každá má na svém C-konci konstitutivně navázanou molekulu kalamodulinu (CaM) (Xia et al., 1998; Schumacher et al., 2001). Podjednotky SK kanálů sdílí topologii s napětově závislými draslíkovými kanály (Kv). Obsahují šest transmembránových  $\alpha$ -šroubovic (S1-6) a oblast P smyčky, která se podílí na tvorbě póru a je lokalizována mezi membránovými  $\alpha$ -šroubovicemi S5 a S6. Membránový segment S4, který je u Kv zodpovědný za napětovou citlivost, obsahuje u SK kanálů méně pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků, což nejspíš způsobí ztrátu citlivosti vůči změnám membránového potenciálu. N- a C-konce podjednotek SK kanálu jsou lokalizovány intracelulárně (Köhler et al., 1996).

Detekce mRNA na základě hybridizace *in situ* (Köhler et al., 1996; Stocker et al., 1999; Stocker and Pedarzani, 2000) a imunohistochemické studie (Bowden et al., 2001; Sailer et al., 2002) prokázaly, že SK kanály jsou v rámci centrálního nervového systému hojně exprimovány. SK1 a SK2 jsou nejvíce exprimovány v hipokampu a v kortexu, zatímco SK3 podjednotka vykazuje nejvyšší míru exprese v oblasti hypotalamu, talamu a středního mozku. Původně byly SK kanály považovány za čistě homomerní struktury (Sailer et al., 2002). Nedávné studie ukázaly, že jednotlivé podjednotky mohou tvořit heteromerní kanály, pokud jsou exprimovány v heterologních expresních systémech (Benton et al., 2003; Monaghan et al., 2004), a posléze



byla schopnost heteromerizace mezi podjednotkami SK kanálů ukázána i *in vivo* (Strassmaier et al., 2005).



**Obr. 8. Struktura a aktivace na vápníku závislého draslíkového kanálu (SK)**

**A,** Všechny podjednotky SK kanálu mají intracelulární N-konec, 6 transmembránových domén spojených kličkami a intracelulární C-konec. P-klička spojující 5. a 6. transmembránovou doménu se podílí na tvorbě draslíkového propustného póru. **B,** SK kanály jsou tetramerní struktury. Schéma ukazuje uspořádání podjednotek a membránových domén při tvorbě SK kanálu. **C,** Průřez SK kanálem. Každá z podjednotek tetrameru má na svém C-konci konstitutivně navázanou molekulu kalmodulinu. Po vazbě vápníku na všechny molekuly kalmodulinu dojde k interakci vždy mezi dvěma jeho molekulami a výsledná konformační změna zajistí otevření SK kanálu.

### 1.6.2. Aktivace a biofyzikální vlastnosti SK kanálů

SK kanály se otvírají v důsledku konformačních změn, vyvolaných vazbou  $\text{Ca}^{2+}$  na všechny čtyři molekuly CaM, konstitutivně spojených s podjednotkami SK. Vazba  $\text{Ca}^{2+}$  iontů umožní interakci dvou sousedních molekul CaM, takže vzniká dimer dimerů podjednotek SK kanálů a dochází k otevření SK póru (Xia et al., 1998; Keen et al., 1999; Schumacher et al., 2001). Analýza křivek závislosti odpovědi SK kanálů na intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  ukázala hodnoty  $\text{EC}_{50}$  0,3-0,7  $\mu\text{M}$  a Hillův koeficient 3-5. (Köhler et al., 1996; Hirschberg et al., 1998; Xia et al., 1998). Aktivované SK kanály se otvírají do stavů s nízkou vodivostí, ~10-14 pS (Blatz and Magleby, 1986; Park, 1994). Kinetický model jejich aktivace obsahuje čtyři uzavřené

a dva otevřené stavy. Přechod mezi jednotlivými uzavřenými stavy je závislý na vápníku (Hirschberg et al., 1998).

Navzdory necitlivosti SK kanálu k membránovému potenciálu má jeho proudově-napěťová závislost dovnitř usměrněný charakter (Köhler et al., 1996; Xia et al., 1998; Soh and Park, 2001). Je to důsledek intracelulárního bloku SK kanálu dvojmocnými kationty ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), které se na pozitivních potenciálech váží do oblasti P-smyčky. Díky vysoké specifitě CaM pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, ostatní dvojmocné kationty SK kanály neaktivují a převažuje jejich inhibiční vliv (Soh and Park, 2001). Dynamické změny intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v kombinaci s možností  $\text{Mg}^{2+}$  blokády tak mohou složitým způsobem ovlivňovat draslíkové proudy zprostředkované SK kanály.

### 1.6.3. Chemické látky ovlivňující aktivitu SK kanálů

Specifickým a vysoko afinitním inhibitorem SK kanálů je toxin včelího jedu, apamin ( $K_D \sim 50\text{pM}$ – $25\text{nM}$  v závislosti na podjednotkovém složení), (Blatz and Magleby, 1986; Maylie et al., 2004). Dalšími inhibitory SK kanálů jsou bicucullin, který je rovněž antagonistou  $\text{GABA}_A$  receptoru, toxin štířího jedu-scyllatoxin, dequalinium, či antagonist nikotinového acetylcholinového receptoru tubokurarin (Liégeois et al., 2003; Faber and Sah, 2007; Wulff et al., 2007). Existuje i několik sloučenin, které pozitivně modulují aktivitu SK kanálů. Jedná se 1-EBIO (1-Ethyl-2-Benzimidazolinone) (Pedarzani et al., 2001), které zvyšuje citlivost SK kanálů k vápenatým iontům, a to patrně stabilizací vazby  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Dalšími jsou DCEBIO (dichloro-EBIO) nebo NS309 (3-oxime-6,7-dichloro-1H-indol-2,3-dion) (Pedarzani et al., 2005). SK kanály jsou též cílem některých antidepresiv (fluoxetine) a antipsychotik (Terstappen et al., 2001; Stocker et al., 2004).

### 1.6.4. Fyziologická úloha SK kanálů

Mírné zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  vede k otevření SK kanálů, následované výtokem  $\text{K}^+$  z buňky. Aktivace SK kanálů navíc působí proti dalšímu zvyšování intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a tak se SK podílí na časoprostorové regulaci přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontu působícího v mnoha buněčných signálních drahách. Vzhledem k jejich hojnému výskytu v nervové soustavě a citlivosti k  $\text{Ca}^{2+}$ , představují SK kanály významný faktor v mechanismech zpětnovazebné kontroly mnoha neuronálních procesů, jako je: opakovaná neuronální aktivita, excitabilita dendritů, synaptický přenos a jeho plasticita. Známým a dobře prostudovaným příkladem jejich funkce je SK-závislá AHP následující AP. Tato fáze je vyvolána přechodným zvýšením intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v průběhu AP, což vede k aktivaci SK kanálů a vzniku

ven směřujících  $K^+$  proudů a hyperpolarizaci membránového potenciálu. V závislosti na délce trvání a amplitudě AHP následně dochází k modulaci frekvence a přesnosti opakované nadprahové aktivity nervových buněk. To bylo ukázáno např. u Purkyňových buněk mozečku (Edgerton and Reinhart, 2003; Swensen and Bean, 2003), dopaminergních neuronech *substantia nigra*, ventrální tegmentální oblasti (Wolfart et al., 2001; Waroux et al., 2005), či *nucleus reticularis thalami* (Bal and McCormick, 1993; Cueni et al., 2008), kde se SK kanály účastní udávání frekvence pacemakerové aktivity, či regulují přepínání mezi tonickým a fázikým módem neuronální signalizace. Účast SK kanálů v regulaci vzrušivosti jednotlivých struktur ukazuje na jejich důležitou roli v kontrole motoriky, paměti, odměny a motivace, či spánkových cyklů.

Imunohistochemickými metodami byla prokázána přítomnost SK kanálů na dendritech neuronů, což naznačilo, že by se mohly účastnit regulace integrace dendritických signálů. (Sailer et al., 2002; Sailer et al., 2004). Role SK kanálů v dendritické integraci byla posléze prokázána v různých mozkových strukturách, např. na terminálních dendritech CA1 neuronů hipokampu. Zde vysokofrekvenční stimulace glutamátergních synapsí vede k postsynaptické depolarizaci a aktivaci VGCC. Vzniklé  $Ca^{2+}$  proudy vyvolávají regenerativní vápníkové potenciály (tzv. calcium spikes) šířící se přes jednotlivé části dendritického stromu (Wei et al., 2001). Vtok  $Ca^{2+}$  iontů ale aktivuje SK kanály, které trvání vápníkových potenciálů zkracují. Rychle inaktivující draslíkové proudy nesené SK kanály tak přispívají k omezení vápníkových potenciálů na jednotlivé dendritické větve a k jejich funkci částečně autonomních synaptických integrátorů (Cai et al., 2004).

SK kanály přímo ovlivňují excitační synaptický přenos v CA1 oblasti hipokampu. Jejich aktivace v průběhu synaptické transmise zpětnovazebně reguluje aktivitu NMDA receptorů. SK kanály způsobená hyperpolarizace buňky vede k obnovení  $Mg^{2+}$  bloku NMDA receptorů, snižuje tak vtok  $Ca^{2+}$  nutný pro indukci synaptické plasticity (Tzounopoulos and Stackman, 2003). Inhibice SK kanálů apaminem vede k facilitaci LTP závislé na NMDA receptorech. V souladu s předpokladem, že dlouhodobá synaptická plasticita CA1 oblasti hipokampu je mechanistickým podkladem fungování některých paměťových funkcí, bylo prokázáno, že systémové podávání apaminu zlepšuje výkon testovaných zvířat v Morisově vodním bludišti i v neprostorových na hipokampu závislých úlohách (Stackman et al., 2002).

## 2. Cíle práce

Cílem dizertační práce bylo studovat podjednotkové složení a fyziologickou úlohu receptorů pro inhibiční aminokyseliny na neuronech MNTB.

V rámci hlavního cíle pak byly stanoveny následující čtyři dílčí cíle:

1. Odhalit podjednotkové složení a funkci pre- a postsynaptických GlyR na neuronech Heldovy synapse v řezech MNTB izolovaných z mladých potkanů.

2. Určit úlohu senzorické aktivity v procesech vývojové plasticity inhibičního systému v MNTB pomocí oboustranné kochleární ablace.

3. Prokázat, že presynaptické GABA<sub>B</sub> receptory modulují glutamátergní přenos na Heldově synapsi *in vivo* a zjistit, zda jsou tyto receptory tonicky aktivovány zbytkovou koncentrací endogenního agonisty.

4. Nalézt funkci postsynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů u hlavních neuronů v řezech MNTB.

### **3. Materiál a metody**

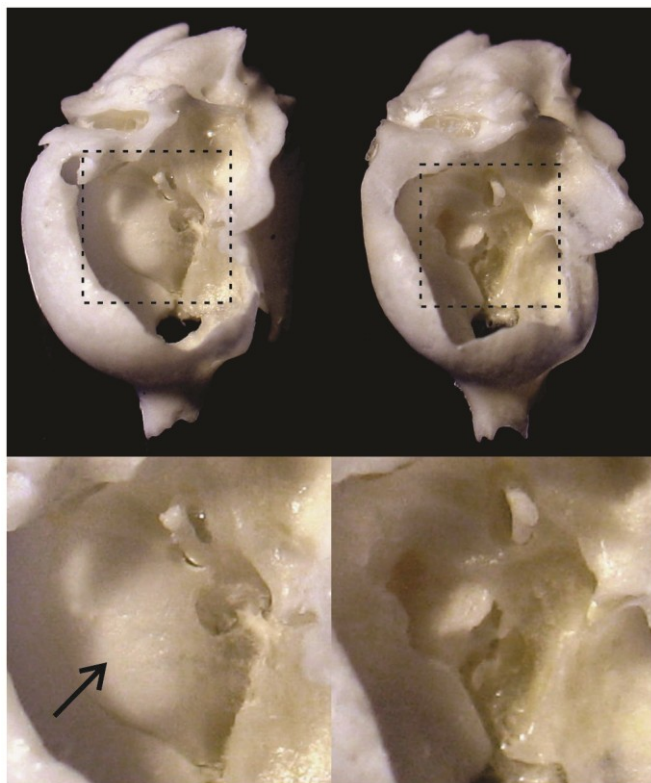
#### **3.1. Zvířata použita v pokusech**

Pro elektrofyziologické a imunohistochemické pokusy na mozkových řezech byly použiti potkani kmene Wistar, myši kmenů BALB/c, C57BL/6, myši s chybějícími SK1 nebo SK2 kanály (SK1 KO nebo SK2 KO (Bond et al., 2004)). Myši byly laskavě poskytnuty Prof. J. P. Adelmanem (Vollum Institute, Portland, Oregon 97239). Pokusy na mutantních myších jsme provedli v laboratoři Prof. Bettlera (Biozentrum, University of Basel, Switzerland). Se zvířaty bylo nakládáno v souladu se Zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, České republiky, v souladu s požadavky Animal Ethics Committee of the Erasmus MC a the veterinary Office of Basel-Stadt. Všechny pokusy byly provedeny v souladu se směrnicemi Rady Evropského společenství 86/609/EEC.

#### **3.2. Kochleární ablace**

Bilateralní kochleární ablace byla provedena na potkaních mláďatech starých 5-6 dní (P5-P6), tj. přibližně týden před nástupem slyšení. Potkaní mláďata byla uvedena do anestezie pomocí izofluranových par. Stav anestezie byl kontrolován na základě odpovědi na bolestivou stimulaci. Řez kůží byl veden ventrálně od ušního boltce. Poté byly tupým přístupem narušeny svaly, aby byla zpřístupněna stěna dosud chrupavčité buly, kde byl řezem proveden otvor. Přes středoušní dutinu byla mechanicky rozrušena kochlea a její části odstraněny jemnou pinzetou. Oblast středoušní dutiny pak byla vyplněna gelovou pěnou (SUGI, REF 31603, Kettenbach) napuštěnou ototoxickou látkou (kanamycin sulfát, 100 mg/ml) a rána byla zašita. Polovina každého vrhu sloužila jako kontrola. Kontrolním potkaním mláďatům byl proveden řez za ušním boltcem, který byl následně zašit a zvířata byla ponechána pod izofluranovou anestézi po stejnou dobu, jako operovaná zvířata. Všem zvířatům byla podána analgésie (novalgín intramuskulárně 40ul (0,5 g/ml)) a anestézie byla ukončena. Zvířata byla umístěna na vyhřívanou podložku a po probuzení vrácena k matkám, s nimiž byla ponechána dalších 6-10 dní. Sluchové prahy pak byly stanoveny snímáním evokovaných kmenových sluchových potenciálů (ABR) z povrchu kalvy těsně před usmrcením zvířete. Snímání evokovaných potenciálů provedli RNDr. Jiří Popelář, Ph.D. a Mgr. Jolana Grécová na Oddělení neurofyziologie sluchu, ÚEM AV ČR.

Posmrtně pak byla sledována nepřítomnost kochley a to otevřením středoušní dutiny pod disekčním mikroskopem (Obr. 9).



**Obr. 9. Kontrola úspěšnosti experimentálního odstranění kochleárního**

*Snímky nahoře ukazují pohled do otevřené středoušní dutiny kontrolního zvířete (vlevo) a zvířete po kochleotomii (vpravo). Oblast vnitřního ucha je zobrazena v dolní části obrázku ve výřezech s větším zvětšením. Vlevo dole lze vidět stěnu kostěného hlemýžďe kontrolního zvířete (šipka). Pravý dolní obrázek ukazuje totéž místo u zvířete, u kterého bylo vnitřní ucho zničeno.*

### 3.3. Příprava řezů pro elektrofyziologické pokusy

Pokusy v první, druhé a čtvrté části práce jsme prováděli na řezech mozkovým kmenem z potkana a myši.

Elektrofyziologické pokusy byly prováděny na živých mozkových řezech izolovaných z potkanů (P12-18) a myši (P8-P12 nebo P18-28). Zvířata byla usmrcena dekapitací. Mozek byl okamžitě vyňat a přenesen do ledově chladného arteficiálního cerebrospinálního roztoku (aCSF) s nízkým obsahem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Roztok obsahoval (v mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2,5  $\text{MgCl}_2$ , 0,1  $\text{CaCl}_2$ , 25 glukózu, 1,25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25  $\text{NaHCO}_2$ , 0,5 kyselinu askorbovou, 3 myo-inositol,

and 3 pyruvát sodný. Roztok byl okysličován směsí 5% CO<sub>2</sub> s 95% O<sub>2</sub> a měl pH 7,3. V tomtéž roztoku byly za použití VT1200S vibratomu (Leica) nakrájeny řezy mozkovým kmenem silné 230–280  $\mu$ m. Řezy byly inkubovány 30 min při 37°C, následně skladovány v pokojové teplotě (21–23°C). Inkubace a skladování řezů probíhaly ve standardním aCSF (aCSF I, kapitola 3.4.1), ve kterém byly koncentrace MgCl<sub>2</sub> a CaCl<sub>2</sub> upraveny na 1 a 2 mM.

### 3.4. Elektrofyziologické metody

#### 3.4.1. Experimentální roztoky

Používali jsme následující typy experimentálních roztoků:

**Standardní arteficielní cerebrospinální roztok (aCSF) I** byl použit v případě aplikace látek ovlivňujících aktivitu receptorů a iontových kanálů v promývacím roztoku a měl složení (v mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 25 glukóza, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 kyselina askorbová, 3 myo-inositol, and 3 pyruvát sodný; roztok byl syčen 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>, pH 7,3.

**aCSF II** (použit pro lokální aplikace látek ovlivňujících aktivitu receptorů a iontových kanálů) měl složení (v mM): 145 NaCl, 2,5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 25 glukóza, 10 HEPES, pH 7.3 (syčen O<sub>2</sub>).

**Intracelulární roztok I** (snímání proudů vyvolaných aplikací agonisty GABA<sub>A</sub>R a GlyR a miniaturních inhibičních postsynaptických proudů (mIPSC)) měl složení (v mM): 125 CsMeSO<sub>3</sub>, 15 CsCl, 5 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 4 ATP, 0,6 GTP, 10 fosfokreatin, a 0,4 Lucifer yellow, pH 7,25, 295 mOsm

**Intracelulární roztok II** (snímání inhibičních postsynaptických proudů (IPSC) vyvolaných elektrickou stimulací) měl složení totožné s intracelulárním roztokem I a obsahoval navíc 2 mM QX314.

**Intracelulární roztok III** (snímání excitačních postsynaptických proudů (EPSC) vyvolaných elektrickou stimulací) měl složení (v mM): 135 CsF, 5 CsCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 2 QX314, 4 ATP, 0,6 GTP, a 10 fosfokreatin, pH 7,25, 295 mOsm.

**Intracelulární roztok IV** (snímání AP a snímání SK kanály neseného proudu) měl složení (v mM): 115,5 K glukonát, 32,5 KCl, 0,1 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 4 ATP, 0,6 GTP, 10 fosfokreatin, pH 7,25, 285 mOsm.

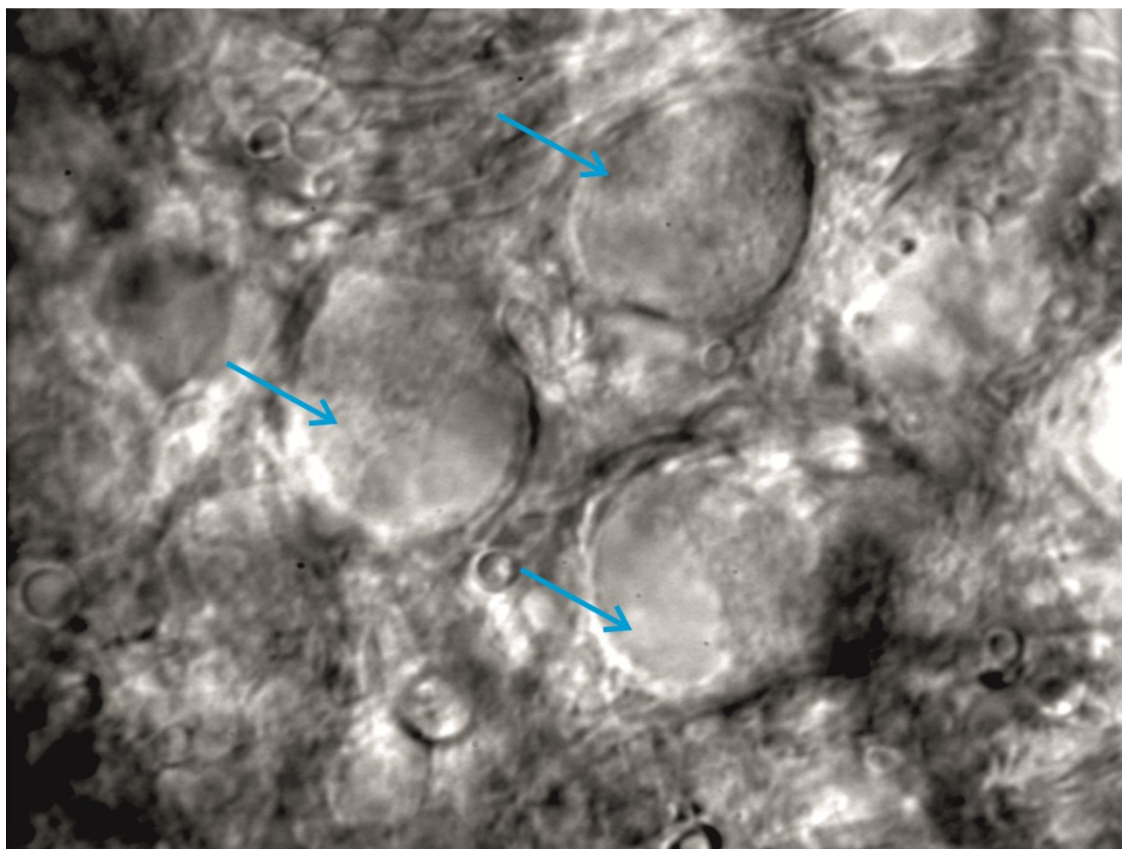
**Intracelulární roztok V** (snímání AP), složení (v mM): 107,5 K glukonát, 32,5 KCl, 12,5 BAPTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 4 ATP, 0,6 GTP, 10 fosfokreatin, pH 7,25, 300 mOsm.

**Intracelulární roztok VI** (snímání vápníkových proudů) (v mM): 125 CsMeSO<sub>3</sub>, 15 CsCl, 5 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 4 ATP, 0,6 GTP, 10 fosfokreatin, pH 7,25, 295 mOsm.

Použité chemikálie pocházely ze Sigma-Aldrich, Tocris Bioscience, či Alomone Labs.

### 3.4.2. Vizualizace a identifikace buněk:

Pro snímání z MNTB jsme použili koronální řezy, pro snímání z AVCN pak byly použity řezy parasagitální. Během snímání byly MNTB neurony pozorovány s použitím mikroskopu Zeiss Axioskop FS2-plus vybaveného diferenciálním interferenčním kontrastem a imerzním objektivem (vodní imerze) zvětšujícím 60x (Olympus). Zobrazení řezu mozkovým kmenem ukazuje Obr. 10.

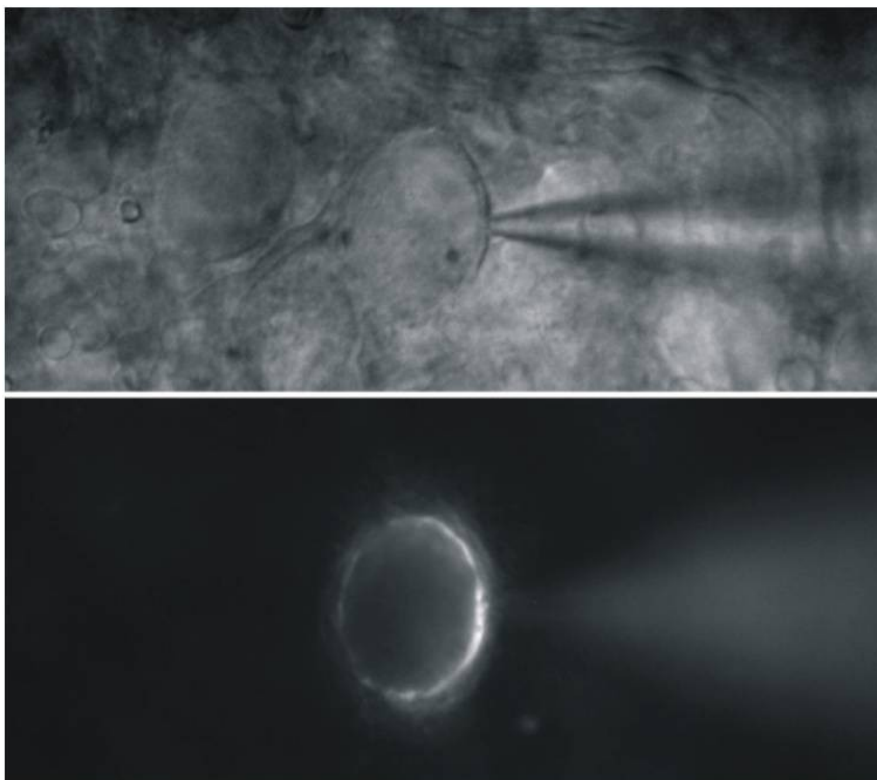


**Obr. 10. Řez MNTB**

*Mikrofotografie živého řezu mozkovým kmenem, použitého pro elektrofyziologické pokusy a zobrazeného pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu. Řez obsahuje oválné hlavní neurony MNTB (šipka) o průměru 15-20  $\mu$ m.*



Postsynaptické hlavní neurony byly identifikovány na základě jejich typické morfologie (kulovité buňky s průměrem 15-20  $\mu\text{m}$ ) a jejich elektrofyziologických vlastností (odpovídají tvorbou jednoho AP na dlouhé depolarizační stimuly a mají schopnost vytvářet spontánní a vyvolané synaptické proudy). Presynaptické Heldovy kalichy byly plněny fluorescenčním barvivem (Lucifer yellow) přítomným ve snímacích mikropipetách a identifikovány jako neuronální výběžek obklopující tělo hlavního neuronu (Forsythe, 1994; Turecek and Trussell, 2001) (Obr.11).



**Obr. 11. Vizualizace Heldova kalichu při elektrofyziologických pokusech**

*Presynaptický terminál byl v průběhu snímání plněn fluorescenčním barvivem obsaženým v intracelulárním roztoku ve snímací pipetce. Po ukončení pokusu byl Heldův kalich pozorován fluorescenčním mikroskopem. Nahoře, Supravitální řez MNTB potkana zobrazený světelným mikroskopem. Uprostřed obrázku lze vidět Heldovu synapsi se snímací elektrodou. Dole, je možno vidět zobrazení téhož místa ve fluorescenčním mikroskopu. Heldův kalich, z něhož bylo snímáno, lze pozorovat jako tenký prstenec po obvodu hlavního neuronu.*

Globulární buňky AVCN (globular bushy cells, GBC) byly značeny pomocí barviva lucifer yellow ve snímací pipetě nebo retrográdním značením dextranovými konjugáty s Alexa Fluor 488, které byly injikovány do střední části ventrální strany mozkového kmene. Morfologicky byly identifikovány jako oválné buňky s excentrickým jádrem a jedním keříčkovitým dendritem a nacházely se mezi bifurkacemi vláken vstupujícího sluchového nervu (Willard and Ryugo, 1983) (Obr. 22).

### **3.4.3. Technika terčíkového zámku**

Snímání proudových a napěťových odpovědí nervových buněk jsme prováděli pomocí mikropipet vytažených z trubiček z borosilikátového skla (vnější průměr 1,5 mm, vnitřní průměr 0,75 mm) s filamentem. Při snímání v módu napěťového zámku (voltage clamp, VC) byl odpor mikropipet po jejich naplnění intracelulárním roztokem 2-3 M $\Omega$  (snímání z celých neuronů) a 5-6 M $\Omega$  (snímání z presynaptických zakončení). Sériový odpor během snímání z celých neuronů byl menší než 5 M $\Omega$  a byl elektronicky kompenzován na 90%. Sériový odpor během snímání z presynaptických zakončení byl menší než 15 M $\Omega$  a byl elektronicky kompenzován na 80%. V části pokusů jsme použili techniku proudového zámku (current clamp, CC) a vodivostního zámku (dynamic /conductance clamp, DC) (Robinson and Kawai, 1993; Sharp et al., 1993). Pro tato snímání dosahoval odpor skleněných mikropipet po naplnění intracelulárním roztokem 4-5 M $\Omega$ .

Proudové a napěťové odpovědi neuronů byly snímány s použitím zesilovače Axopatch 200B (Molecular Devices). Filtrovací frekvence snímaných odpovědí byla 1 kHz pro agonistou vyvolané proudy a 10 kHz pro synaptické proudy. Při snímání buněčných potenciálů byla použita filtrovací frekvence 10 kHz, při snímání proudů tekoucích VGCC a SK byla filtrovací frekvence 5 kHz. Digitalizace probíhala za použití A/D převodníku (Digidata 1322A či Digidata 1440) a software pCLAMP9.2 (Molecular Devices). Vzorkovací frekvence použitá pro agonistou vyvolané proudy byla 2 kHz, pro synaptické proudy pak 20 kHz. Použitá vzorkovací frekvence pro snímání změn membránových potenciálů byla 50 kHz, pro snímání proudů tekoucích VGCC 20 kHz a 10 kHz při snímání proudů tekoucích SK kanály.

### **3.4.4. Snímání synaptických a membránových potenciálů a proudů.**

EPSC a IPSC byly vyvolávány napěťovými pulzy (100  $\mu$ s, 5–10 V, Master-8, A.M.P.I) dodávanými do promývacího roztoku přes skleněnou pipetu. Snímání probíhalo za fyziologické teploty.

AP vyvolány proudovými injekcemi do hlavního neuronu přes snímací pipetu. Pro snímání v módu CC se jednalo o krátké pravoúhlé depolarizační pulzy (0,4-0,9 nA/ 0,5 ms). Snímání probíhalo za pokojové teploty.

V části pokusů (viz Výsledky) jsme použili techniku vodivostního zámku (dynamic/conductance clamp, DC) (Robinson and Kawai, 1993; Sharp et al., 1993). Tyto pokusy byly provedeny ve spolupráci s A. Klugem, Ph. D., Ludwig-Maximilians-University, Mnichov. DC je elektrofyziologická metoda, která v reálném čase využívá rozhraní mezi buňkou a počítačem (analogovým přístrojem) k simulaci dynamických procesů v živých buňkách. Snímaný membránový elektrický potenciál buňky je zesílen a přiveden na vstup DC zesilovače. Tento přístroj z něj na základě námi poskytnuté modelové (synaptické) vodivosti ( $g$ ) vypočítává proud, který injikuje zpět do buňky. Výpočet probíhá podle rovnice  $I = g \cdot (V - E)$  ( $E$  je reverzní potenciál pro danou vodivost,  $V$  je aktuální membránový potenciál). Existence zpětnovazebného okruhu, který s vysokou vzorkovací frekvencí koriguje injikovaný proud dle modelové vodivosti a aktuálního membránového potenciálu zajišťuje, že buňka obdrží stejný proud, jako kdyby byla stimulována přirozenou (synaptickou) aktivitou. Snímání v módu DC probíhalo za fyziologické teploty (37°C). EPSG byly simulovány SM-1 zesilovačem (Cambridge Conductance). Reakční doba (z 10 na 90% amplitudy proudového výstupu) zesilovače ke změně vstupního napětí činila 290 ns. Reverzní potenciály pro EPSG byly nastaveny na 0 mV. Průběhy injikovaných vodivostí byly nasnímány přednostně za fyziologické teploty jako EPSC v módu VC stejným způsobem, jak je uvedeno výše. Po extrapolaci stimulačních artefaktů, byly převedeny na EPSG na základě známého potenciálu. Injikovaný proud byl pro každou buňku na počátku snímání arbitrárně upraven tak, aby pravděpodobnost výskytu AP v sériích o 20 stimulech byla zhruba 50% při snímání v kontrolních podmínkách.

Při snímání aktivity VGCC byly buňky drženy na klidovém potenciálu -60 mV. Napětově závislé vápníkové kanály byly aktivovány dle protokolu sestávajícího se z předhyperpolarizace z klidového potenciálu o -20 mV/10 ms následované depolarizací na 0 mV/50 ms. Snímání probíhalo za pokojové teploty. Byly snímány i proudové odpovědi SK kanálů. Proudové tekoucí SK kanály byly zajištěny vtokem vápníku přes NMDA receptory. NMDA receptory byly aktivovány depolarizací (na -30 mV/800 ms) a současnou tlakovou aplikací jejich agonisty 1 mM NMDA (viz kapitola 4.4.3.). Snímání probíhalo za pokojové teploty.

### **3.4.5. Aplikace roztoků látek ovlivňujících aktivitu receptorů a inotových kanálů**

Při snímání agonistou vyvolaných proudů byly exogenní agonisté a modulátory aktivity inhibičních receptorů rozpuštěny v aCSF II založeném na pufru HEPES a aplikovány na povrch buněk tlakovou injekcí (Picospritzer III; General Valve). Skleněné pipetky pro aplikaci látek měly ve špičce průměr 3-4  $\mu\text{m}$  a jejich ústí bylo umístěno do vzdálenosti 20  $\mu\text{m}$  od zkoumané buňky. Tlak pro aplikaci činil 3-6 psi (1psi~6,89 kPa). V aplikačních trubičkách byl promývací roztok aCSFII, který obsahoval agonisty nebo modulátory aktivity ionotropních receptorů.

Pro snímání synaptických proudů, membránových potenciálů a vápníkových proudů byl použit bikarbonátový promývací roztok aCSFI. Agonisté receptorů a modulátory aktivity iontových kanálů byly rozpuštěny v aCSFI a aplikovány na mozkové řezy perfúzí.

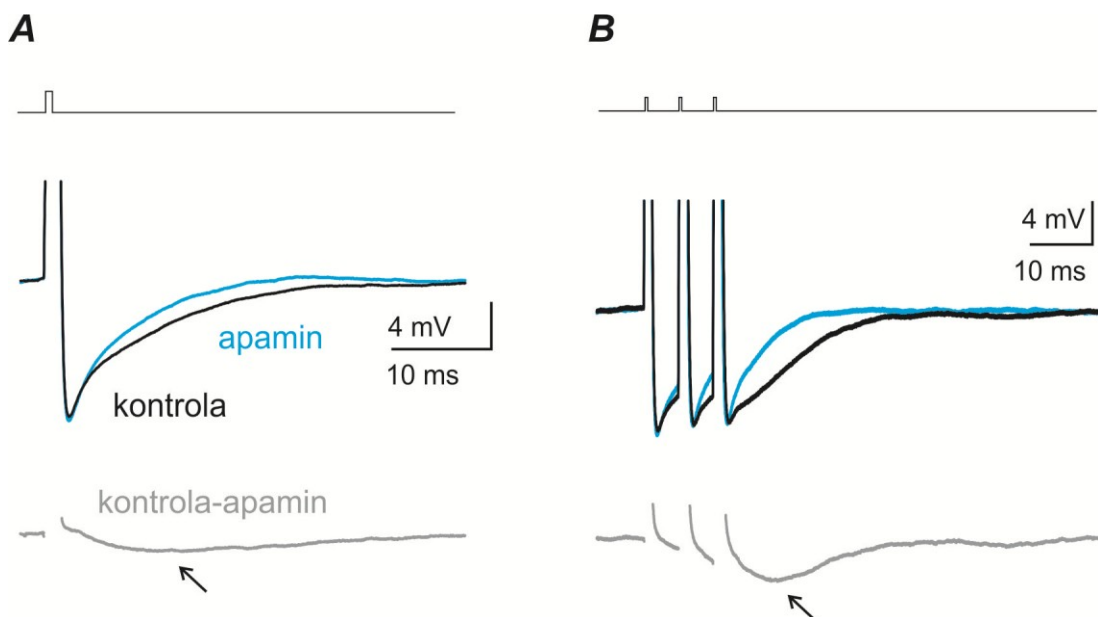
### **3.4.6. Analýza a statistické zpracování naměřených dat**

Proudové a napěťové odpovědi neuronálních buněk byly analyzovány s použitím pCLAMP9.2 a GraphPad Prism. Pokud není uvedeno jinak, jsou výsledky udávány ve tvaru průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Počet buněk vzatých do analýzy je označen  $n$ . Statistická významnost odchylky mezi průměry byla zhodnocena párovým Studentovým  $t$  testem, ANOVA testem a Tuckeyho vícečetným srovnávacím testem. Pro srovnávání kumulativních distribucí byl použit nepárový Kolmogorov-Smirnovův test. Pro uznání statistické významnosti jsme zvolili hladinu 5%.

Uváděné hodnoty membránového potenciálu jsou již po úpravě o potenciál vznikající na rozhraní mezi intracelulárním a extracelulárním roztokem (liquid junction potential, LJP).

Kapacitance membrány byla vypočtena z časové konstanty membrány získané z napěťových odpovědí buněk vyvolaných pravoúhlými proudovými stimuly o nízké amplitudě (100 ms, 0,01 nA).

Analýza mAHP byla provedena tak, že pro každou buňku byly na konci pokusu nasnímány AP a jejich série v přítomnosti apaminu, látky, která mAHP selektivně blokovala. Od odpovědí nasnímaných v přítomnosti apaminu byly pak odečteny odpovědi nasnímané za kontrolních podmínek a odpovědi snímané v testované látce. Pro každý odečet byla v čase po hrotu AP stanovena maximální výchylka vzhledem ke klidové hodnotě membránového potenciálu. Tato hodnota odpovídala mAHP (Obr. 12)



**Obr. 12. Detekce mAHP**

*A, B, Příklady jednotlivých AP a jejich sérií (3@200 Hz) vyvolaných proudovými stimuly přivedenými na membránu hlavního neuronu MNTB nasnímaných za kontrolních podmínek (černě) a v přítomnosti apaminu (selektivního inhibitoru mAHP). Šedá stopa odpovídá odečtům záznamů nasnímaných v kontrole od záznamů nasnímaných v přítomnosti apaminu. Šipka ukazuje mAHP, která dosahovala maximální amplitudy v čase  $11,3 \pm 1,8$  ms, po pozitivním maximu AP.*

### 3.4.7. Imunohistochemie

#### 3.4.7.1. Retrográdní značení neuronálních buněk

Imunohistochemické pokusy byly provedeny ve spolupráci s Mgr. Johanou Trojanovou, Ph.D. z oddělení Neurofyzologie sluchu. K pokusům byli použiti potkani kmene Wistar ve věku P12-P18. Zvířata byla dekapitována, a mozek rychle vyjmut v ledově chladném Ringerově roztoku s nízkou koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  (viz kapitola 3.3). Biotinylovaný dextran amin w/v (10% BDA, 10 kDa; Molecular Probes) byl injikován z ventrální strany mozkového kmene do svazku axonů probíhajících z AVCN a to těsně před jejich překřížením (tj. mírně laterálně od mediální roviny). Aplikace byla prováděna skleněnou mikropipetou o průměru 15-20  $\mu\text{m}$  pod nízkým tlakem za vizuální kontroly ve stereomikroskopu Leica S6E. Izolovaný mozkový kmen byl inkubován při pokojové teplotě v extracelulárním roztoku probublávaném kyslíkem po dobu 6 hodin. Po té z něj byly připraveny řezy, které byly fixovány přes noc při 4°C čerstvým roztokem obsahujícím: 0.1 M phosphate buffer (PB~  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (82,5 mM),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , (17,5 mM); pH 7.4) s 4% (w/v) paraformaldehydem (PFA). Druhý den byly řezy

několikrát promyty PB a inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě se streptavidinem konjugovaným s Alexa Fluor488. Řezy byly opět promyty 0,1 M PB a zamontovány do média Aqua Poly/mount (Polysciences).

#### **3.4.7.2. Roztoky a příprava řezů pro fluorescenční mikroskopii**

Pro imunofluorescenční pokusy byli použiti dospělí potkani kmene Wistar (P57-P87), nebo myši kmene BALB/c (P18-P28). Po vystavení parám izofluranu byla zvířata uvedena do hluboké anestézie za použití ketamin–xylazin (100 mg/kg, 16 mg/kg tělesné váhy, intraperitoneálně, (Calypsol, Richter Gedeon, Xylapan, Vétiquiol)). Poté jim byla provedena transkardiální perfúze fyziologickým roztokem (0.9% NaCl) s heparinem (5 000 mezinárodních jednotek na 150 ml fyziologického roztoku) následovaná perfúzí čerstvým fixačním roztokem obsahujícím: 0,1 M PB s 4% (w/v) paraformaldehydem (PFA). Po perfúzi byl mozek vyjmut a v roztoku PB byly nakrájeny koronální, nebo parasagitální řezy mozkového kmene silné 300  $\mu\text{m}$  s použitím vibračního mikrotomu Leica VT1000. Řezy byly několikrát promyty v 0,1 M PB a prosyceny pomocí vzestupné řady roztoků sacharózy a to 10% w/v po dobu 1 hod., 20% w/v po dobu 3 hod. a 30% w/v přes noc při pokojové teplotě. Poté byla tkáň po dobu 30 minut při 4°C inkubována v kryoprotektivu (Jung Tissue Freezing Medium, Leica) a nakrájena na kryostatu Leica CM3050 S na řezy o tloušťce 25  $\mu\text{m}$ . Řezy byly přichyceny na podložní skla (Menzel-Gläser SuperFrost®Plus, Gerhard Menzel GmbH), která měla povrch upraven tak, aby se na ně řezy pevně trvale přichytily. Připravené řezy byly skladovány ve zmraženém stavu (-20°C) až do doby aplikace protilátek.

#### **3.4.7.3. Imunohistochemické značení proteinů**

Řezy mozkového kmene potkana byly inkubovány přes noc v roztoku PB obsahujícím 5% (v/v) Chemiblocker (Millipore Bioscience Research Reagents) zabraňujícím nespecifické vazbě primární protilátky, 1% Triton X-100 (v/v) pro buněčnou permeabilizaci, 0.1%  $\text{NaN}_3$  (w/v) ochrana před růstem plísní, a primární protilátky. Pro studium inhibičního systému MNTB jsme použili myši primární protilátky namířené proti  $\alpha 1$  podjednotce GlyR (ředění 1:1000, Synaptic Systems), gefyrinu (1:200, Synaptic Systems), králíčí primární protilátky proti GlyR  $\alpha 1$  (1:600; Synaptic Systems), anti-GlyR  $\alpha 2$  (1:150; Santa Cruz Biotechnology), anti-calretinin (1:200; Invitrogen), a kozí anti-GlyR  $\alpha 3$  (1:150; Santa Cruz Biotechnology). Pro studium SK kanálů jsme použili králíčí anti-SK1 (1:150), anti-SK2 (1:200) a anti-SK3 (1:150), (Sigma). Po inkubaci s primární protilátkou byly řezy promyty a inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 488 (Invitrogen) či s CY3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)

v ředění 1:500 po dobu dvou hodin. Řezy značené BDA byly inkubovány se streptavidinem konjugovaným s Alexa Fluor 488. Krycí skla byla montována s použitím Aqua Poly/Mount (Polysciences). Inkubace probíhaly při pokojové teplotě. Pro kontrolní pokusy byla vynechána inkubace s primární protilátkou. Flourescenční snímky byly získány na konfokálním mikroskopu Leica TSC-SP1 s použitím Leica confocal software 2.5 či na mikroskopu Olympus FluoView FV-300 se software FluoView.

### **3.5. Extracelulární snímání elektrické aktivity MNTB neuronů *in vivo***

Pokusy byly provedeny ve spolupráci s Prof. J. G. Borstem, Erasmus MC, Rotterdam.

#### **3.5.1. Přípravná operace pro snímání z MNTB *in vivo***

Dospělé C57BL/6 myši (P35–P60) byly krátce vystaveny parám izofluranu. Poté jim byl intraperitonálně podán roztok anestézie a myorelaxans (ketamin 65 mg/kg a xylazin 10mg/kg). Pro udržení tělesné teploty (37°C) byla zvířata umístěna na vyhřívanou podložku (FHC) a teplota byla monitorována pomocí rektální sondy. MNTB bylo dosaženo z ventrální strany, procedurou popsanou dříve (Rodríguez-Contreras et al., 2008; Lorteije et al., 2009). Zvířata byla položena do polohy na zádech a hlava byla znehybněna pomocí kovového nástavce přilepeného k dorzální části lebky. Po odstranění kůže z oblasti krku, byly opatrně odstraněny tkáně (tuková a svalová) překrývající tracheu. Zvířatům byla provedena tracheotomie, byla intubována a trachea byla jemně odtlačena stranou. Během celého pokusu byla zvířata mechanicky ventilována kyslíkem (MiniVent; typ 845; Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH). Frekvence ventilace byla kolem 150/min; objem pumpovaný v každém cyklu byl upraven dle váhy zvířete na zhruba 7 $\mu$ l (1/tělesná váha (v g)). Dále byl odstraněn hltan a další tkáně pod ním a odhalena ventrální strana baze lební. Provrtáním lebky byla provedena malá kraniotomie (1-2 mm v průměru). Poloha kraniotomie byla volena na základě vodících znaků na lebce a vaskulatury, která prosvítala skrze ztenčovanou kost. Jednalo se o anteriorní inferiorní mozečkovou arterii a bazilární arterii. Mozkové pleny byly odstraněny z povrchu mozku před začátkem snímání. Povrch mozku byl smáčen aCSF III obsahujícím (v mM): NaCl 135, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 5 (pH 7.2), aby nedošlo k jeho vyschnutí.

### 3.5.2. *In vivo* elektrofyziologie a aplikace látek selektivně ovlivňujících aktivitu GABA<sub>B</sub> receptoru

Snímání z hlavních neuronů MNTB bylo prováděno juxtacelulární technikou (loose patch) s použitím silnostěnných mikropipet s filamentem z borosilikátového skla. Pipety s odporem 3-6 M $\Omega$  byly plněny aCSF III. Před vstupem do mozkové tkáně byl roztok v pipetě pod pozitivním tlakem (300 mbar), aby nedošlo k jejímu ucpání. Po vstupu do tkáně byl tlak snížen zhruba na 30 mbar a při snímání byl roztok v pipetě ponechán zcela bez tlaku. Pro snímání a sběr dat byl použit zesilovač MultiClamp 700B a software pCLAMP9.2 (MDS Analytical Technologies). Měřený signál byl filtrován s frekvencí 10 kHz a vzorkován s frekvencí 50 kHz s použitím A/D převodníku (Digidata 1322A).

Juxtacelulární snímání bylo kombinováno s aplikací chemických látek. V části pokusů byly látky aplikovány perfúzním systémem. U všech těchto pokusů jsme potvrdili, že buňky uložené v hloubce 400-600 nm mohou být dosaženy povrchovou aplikací látek. Aplikace 20 mM EGTA na povrch mozku během 80-120 s u nich zcela zabránila synaptickému přenosu. Druhý způsob představovala aplikace lokální. V tomto případě byla ke snímací pipetě přilepena pětikanálová mikropipeta (5B120F-4; World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) v konfiguraci piggy-back (Havey and Caspary, 1980). Vzdálenost mezi špičkami snímací a vícekanálové elektrody byla kolem 50  $\mu$ M. Ve většině případů byly jednotlivé kapiláry pěti kanálové elektrody naplněny roztoky: 160 mM EGTA (rozpuštěno v 0,9% NaCl a pH 7,2 upraveno NaOH), 10 mM ( $\pm$ )-baclofen (rozpuštěno v 0,9% NaCl a pH 3 upraveno HCl), 1 mM CGP54626 hydrochlorid, 0,9% NaCl (pH 3 upraveno HCl) a 0,9% NaCl (pH 7,2). Použité chemikálie pocházely ze Sigma-Aldrich, Tocris Bioscience, či Alomone Labs.

Jednotlivé kanály byly vodivě spojeny s generátorem iontoforetického proudu (Dagan 6400 Advanced; Minneapolis, MN, USA) pomocí AgCl drátku (elektrody). Pro iontoforetickou aplikaci jsme použili ejekční proudy o velikosti (200-500 nA) po dobu 1-3 min. Kapilára obsahující 0,9% NaCl pH 7,2 pak sloužila jako doplňkový kanál pro automatické vyrovnávání vstřikovaného proudu. Kapiláry obsahující 160 mM EGTA a 0,9% NaCl (pH 3) byly kanály kontrolní. Kanál obsahující 0,9% NaCl (pH 3) sloužil pro nastavení velikosti iontoforetického ejekčního proudu tak, aby nedošlo k ovlivnění synaptického přenosu kyselým pH. Pomocí aplikace EGTA byla testována účinnost iontoforézy. Aplikace vápníkového chelátoru EGTA negativně ovlivňovala synaptický přenos. Vzhledem ke známé exponenciální závislosti množství výlevu neuropřenašeče na extracelulární koncentraci Ca<sup>2+</sup> (Barnes-Davies and Forsythe, 1995; Schneggenburger et al., 1999), bylo z míry inhibice synaptického přenosu EGTA o známé koncentraci přibližně možné odhadnout zředění iontoforetických aplikovaných roztoků v blízkosti



sledovaného hlavního neuronu (podrobně viz Wang et al., 2013). Na základě těchto odhadů byly stanoveny koncentrace baclofenu a CGP546262 použité ve vlastních pokusech. Z přítomnosti plató fáze v průběhu iontoforetické aplikace baclofenu je zřejmé, že použitá koncentrace byla vyhovující a baclofen dosáhl během aplikace saturující koncentrace.

### **3.5.3. Zvuková stimulace *in vivo***

Zvukové stimuly byly prezentovány v konfiguraci uzavřeného pole, podle (Tan and Borst, 2007). Sonda, přes kterou byly prezentovány zvukové stimuly byla vsunuta do levého kanálu vnějšího ucha a zajištěna silikonovým elastomerem. V programu MATLAB (Version R2008a) byl vytvořen stimulační protokol. Zvukový stimulus byl generován Tucker Davis Technologies hardware (TDT, system 3, RX6 processor, PA5.1 attenuator, ED1 electrostatic driver, EC1 electrostatic speaker). Pomocí programu MATLAB, byla zajištěna synchronizace sběru dat programem Clampex s prezentací zvukových stimulů. Stimulační protokol sestával z 200 ms úseku bez zvuku následovaného dvěma 400 ms salvami širokopásmového šumu (šíře pásma 2-40 kHz; 80 dB SPL). Salvy byly prezentovány v různých intervalech (40, 80, 160, 320, 640, 1280 ms) a byly následovány klidovou periodou, takže celková doba trvání protokolu byla 4s. Intenzita zvuku byla kalibrována, jak bylo popsáno dříve (Tan and Borst, 2007). Tento protokol byl stále opakován i během aplikace chemických látek. Na základě získaných dat byly hodnoceny jejich efekty na spontánní a zvukem vyvolanou aktivitu. Pokusy byly prováděny v jednostěnné zvukotěsné komoře (Gretch-Ken Industries).

### **3.5.4. Analýza dat získaných pokusy *in vivo***

Analýza dat byla provedena s použitím procedur běžících v aplikaci NeuroMatic (verze 2.00, poskytnutou Dr J. Rothmanem, University College London, London, UK) v rámci programového balíku Igor Pro 6.2 (WaveMetrics).

Všechna *in vivo* snímání vykazovala přítomnost kapacitně přenášeného presynaptického AP (tzv. prespike). V předchozích pracích bylo ukázáno, že jak amplitudu extracelulárně snímaného EPSP (eEPSP), tak jeho maximální rychlost růstu (eEPSP') lze použít k měření síly synapse (Lorteije et al., 2009). Vzhledem k tomu, že téměř u poloviny buněk, z nichž jsme snímali, bylo těžké odlišit maximální amplitudu eEPSP od nástupu extracelulárně snímaného AP (eAP), použili jsme pro měření síly synapse maximální rychlost růstu eEPSP. Metoda analýzy je popsána v Lorteije et al., 2009. Zjednodušeně lze hledání hodnot eEPSP' u nadprahových událostí popsat takto: Na průběh nasnímaného extracelulárního signálu jsme aplikovali první derivaci. Následně jsme hledali její lokální maximum v oblasti odpovídající eEPSP, tj před

bodem inflexe zachyceném před hrotem následujícího AP. Podprahové události (selhání) byly identifikovány na základě jejich pomalé repolarizační fáze. Velikosti eEPSP' byly měřeny vzhledem ke klidovým hodnotám extracelulárně snímaného potenciálu.

Aplikace látek běžně trvala 2-7 minut. Buňky, které vykazovaly více než 30% navýšení, či snížení frekvence eAPv průběhu aplikace látek ovlivňujících aktivitu GABA<sub>B</sub> receptoru, byly vyřazeny z analýzy. Buňky, které vykazovaly souběžné změny ve tvaru eEPSP'a eAP byly rovněž vyloučeny.

Výsledky z *in vivo* snímání jsou prezentovány výrazem: průměr ± směrodatná odchylka, *n* značí počet buněk zavzatých do analýzy. Statistická významnost odchylky mezi průměry byla zhodnocena Studentovým *t* testem. Pro uznání statistické významnosti jsme zvolili hladinu 5%.

## 4. Výsledky

Výsledky dizertační práce jsou shrnuty v těchto publikacích:

**Hruskova B**, Trojanova J, Kulik A, Bures Z, Kralikova M, Syka J, Trussell LO, Turecek R (2012). Differential distribution of glycine receptor subtypes at the rat calyx of Held synapse. *J Neurosci.* 32 (47): 17012-24.

Wang T, Rusu SI, **Hruskova B**, Turecek R, Borst JG (2013). Modulation of synaptic depression of the calyx of Held synapse by GABA(B) receptors and spontaneous activity. *J Physiol.* 591(19):4877-94

### 4.1. Studium podjednotkového složení GlyR na Heldově synapsi

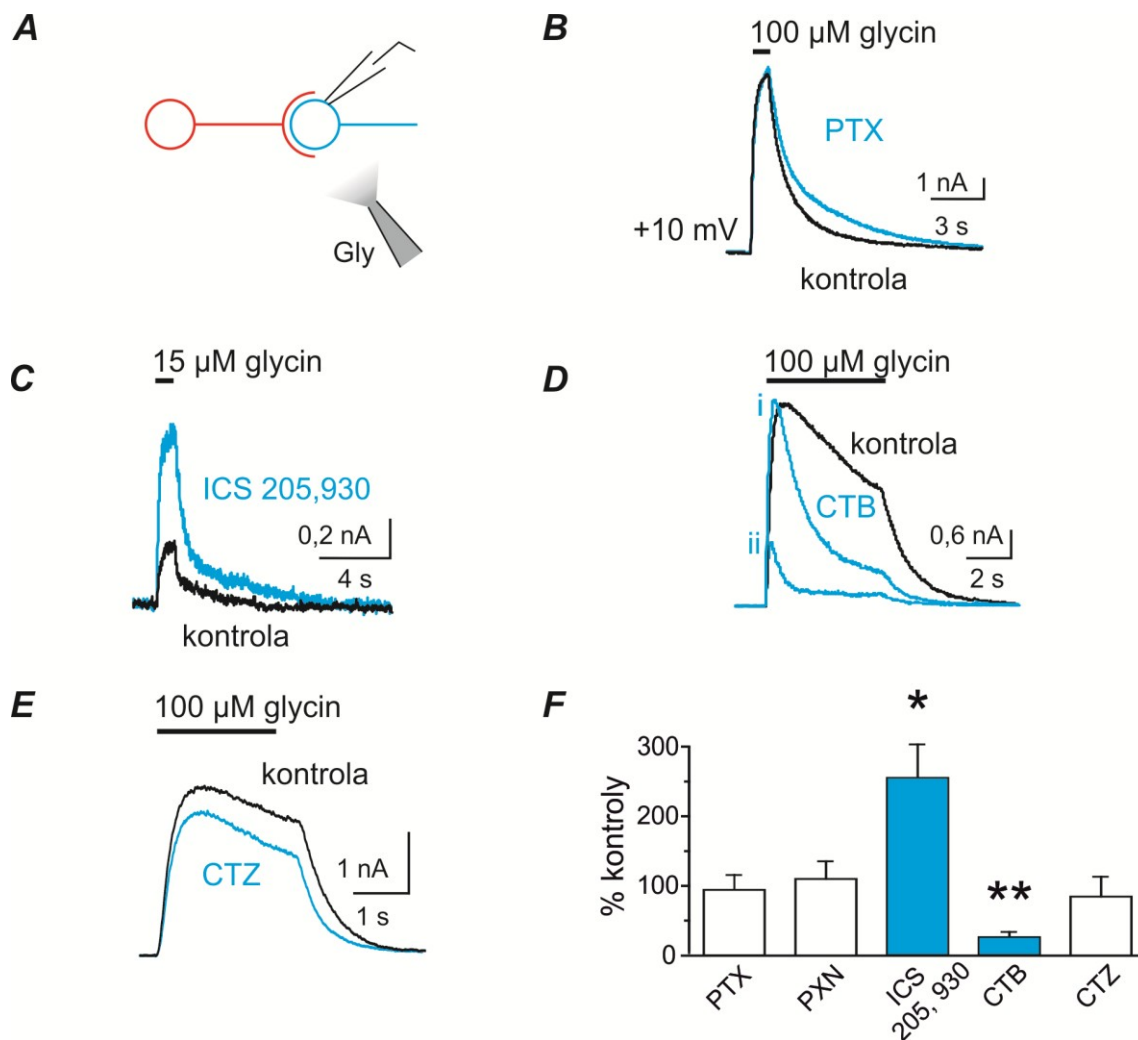
Vlastnosti glycinergního synaptického přenosu byly SOC mozkového kmene savců často zkoumány. Řada prací ukázala, že glycinergní inhibice plní v SOC významnou úlohu v mechanismech umožňujících lokalizaci prostorového zdroje zvuku (Adams and Mugnaini, 1990; Kandler and Gillespie, 2005; Grothe et al., 2010). MNTB, které je součástí SOC, zajišťuje přesně načasované převádění přicházejících signálů na signály výstupní. Modulace glutamatergního přenosu vlivem glycinergní inhibice je důležitou součástí těchto procesů (Kopp-Scheinpflug et al., 2011; Borst and Soria van Hoeve, 2012). Inhibiční vlákna přicházejí do MNTB od neuronů v přilehlém VNTB, nebo se vracejí jako zpětné kolaterály MNTB neuronů (Albrecht et al., 2014; Dondzillo et al., 2016). Jejich inhibiční zakončení uvolňují glycin, který působí na pre- i postsynaptických glycinových receptorech (GlyR) exprimovaných MNTB neurony. Aktivované presynaptické GlyR vyvolávají pomalou potenciaci uvolňování glutamátu, zatímco postsynaptické receptory zajišťují rychlou fázickou inhibici (Turecek and Trussell, 2001; Awatramani et al., 2004, 2005a). Rozdílná kinetika odpovědí pre- a postsynaptických GlyR naznačuje, že by se mohlo jednat o dvě receptorové populace s odlišnými vlastnostmi. Tak jako u jiných typů receptorů, jsou i u GlyR jejich vlastnosti a subcelulární lokalizace závislé na podjednotkovém složení. GlyR jsou pentamery složené z podjednotek  $\alpha 1-4$  a  $\beta$  (Laube et al., 2002; Lynch, 2004; Webb and Lynch, 2007; Legendre et al., 2009). Většinu GlyR dospělých zvířat představují  $\alpha\beta$  heteromery (Lynch, 2009). Ty jsou

shlukovány na postsynaptických místech díky interakci  $\beta$  podjednotky s proteinem gephyrinem (Kneussel and Betz, 2000; Grudzinska et al., 2005). V nepřítomnosti  $\beta$  podjednotky vznikají  $\alpha$  homomerní receptory s rozptýlenou distribucí zejména na extrasynaptických místech a jejich exprese v centrálním nervovém systému probíhá především během prenatálního vývoje (Flint et al., 1998). Přesto byly také pozorovány v nervové tkáni dospělých zvířat (Deleuze et al., 2005; Bae et al., 2016) a mohly by být součástí populace extrasynaptických GlyR na Heldových kališích. V následujících pokusech jsme použili agonisty a antagonisty selektivně působící na GlyR různého podjednotkového složení, abychom identifikovali receptorové podtypy přítomné na pre- a postsynaptických buňkách MNTB.

#### 4.1.1. Postsynaptické GlyR v MNTB

V první části pokusů jsme zjišťovali podjednotkové složení postsynaptických GlyR exprimovaných na tělech a dendritech hlavních neuronů MNTB. Z těchto neuronů jsme snímali proudové odpovědi GlyR vyvolané aplikací glycinu a analyzovali jsme jejich citlivost k látkám selektivně ovlivňujícím různé podtypy GlyR. Glycinem vyvolané odpovědi byly snímány v promývacím roztoku aCSF II doplněném o 0,5  $\mu$ M tetrodotoxin (TTX), 10  $\mu$ M 6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion (DNQX) a 5  $\mu$ M 3-((R)-2-karboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-fosfónovou kyselinu (CPP), abychom zablokovali napětově závislé sodíkové kanály a vodivosti vyvolané glutamátem. Jednosekundové aplikace 100  $\mu$ M glycinu na těla hlavních neuronů (Obr. 13 A) vyvolávaly proudy, které byly inhibovány v přítomnosti strychninu (0,3  $\mu$ M), kompetitivního antagonisty pro chloridy propustných GlyR. Tyto proudy měnily polaritu v blízkosti předpokládaného reverzního (Nernstova) potenciálu pro chloridové ionty, tj. -55,5 mV pro námi použité roztoky (Wu and Kelly, 1995; Turecek and Trussell, 2001, 2002; Price and Trussell, 2006). Průměrná maximální amplituda odpovědi při membránovém potenciálu +10 mV dosahovala  $5,5 \pm 4,8$  nA ( $n = 36$ ). Picrotoxin (PTX; 50  $\mu$ M), který blokuje  $\alpha$  homomerní receptory, ale ne  $\alpha\beta$  heteromerní receptory (Lynch et al., 1995; Wang et al., 2007), významně neovlivnil amplitudy proudů vyvolaných glycinem ( $6,6 \pm 19,3\%$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0,348$ ), (Obr. 13 B). Toto pozorování bylo v souladu s přítomností heteromerních GlyR na somatodendritických částech MNTB neuronů. Složení postsynaptických receptorů bylo ověřováno v následujících pokusech využívajících látku ICS205,930 (tropisetron), o které je známo, že pozitivně moduluje odpovědi  $\alpha\beta$  heteromerních GlyR aktivovaných nízkou koncentrací agonisty (Chesnoy-Marchais, 1996; Supplisson and Chesnoy-Marchais, 2000). Zjistili jsme, že maximální amplitudy proudů vyvolaných aplikací 15  $\mu$ M glycinu ( $0,3 \pm 0,2$  nA,

$n = 6$ ) byly téměř trojnásobně zvýšeny v přítomnosti 1  $\mu\text{M}$  ICS205,930 ( $0,9 \pm 0,8 \text{ nA}$ ,  $p = 0,047$ , Obr. 13 C). Tyto výsledky ukazují, že postsynaptické GlyR v MNTB jsou tvořeny jako  $\alpha\beta$  heteromery.



**Obr. 13. Hlavní neurony MNTB exprimují funkční  $\alpha 1/\beta$  heteromerní GlyR**

**A**, Schéma ukazuje snímání glycinem vyvolaných proudů z hlavního neuronu MNTB. **B**, Příklad proudové odpovědi GlyR v nepřítomnosti (černě) a v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$  PTX (modře). **C**, Amplitudy odpovědi vyvolaných nízkou koncentrací glycinu byly zvýšeny v přítomnosti 1  $\mu\text{M}$  ICS205,930. **D**, Glycinové proudy nasnímané v nepřítomnosti (černě) a přítomnosti (modře) 5  $\mu\text{M}$  CTB v 1 minutových intervalech. Při snímání v CTB byly MNTB neurony udržovány v přítomnosti této látky před a v průběhu snímání glycinových odpovědí. Amplituda odpovědi vyvolané první koaplikací byla nezměněna (i). 10 po sobě jdoucích koaplikací vedlo k silné inhibici glycinové odpovědi (ii). **E**, Příklad glycinem vyvolaných

*proudů snímaných v nepřítomnosti (černě) nebo v přítomnosti (modře) 100  $\mu$ M CTZ. F, Sloupcový graf shrnuje vlivy všech testovaných podjednotkově specifických látek na amplitudy glycinem vyvolaných odpovědí získaných z 35 neuronů (\* $p < 0,05$ , či \*\* $p < 0,01$ , párový  $t$ . test).*

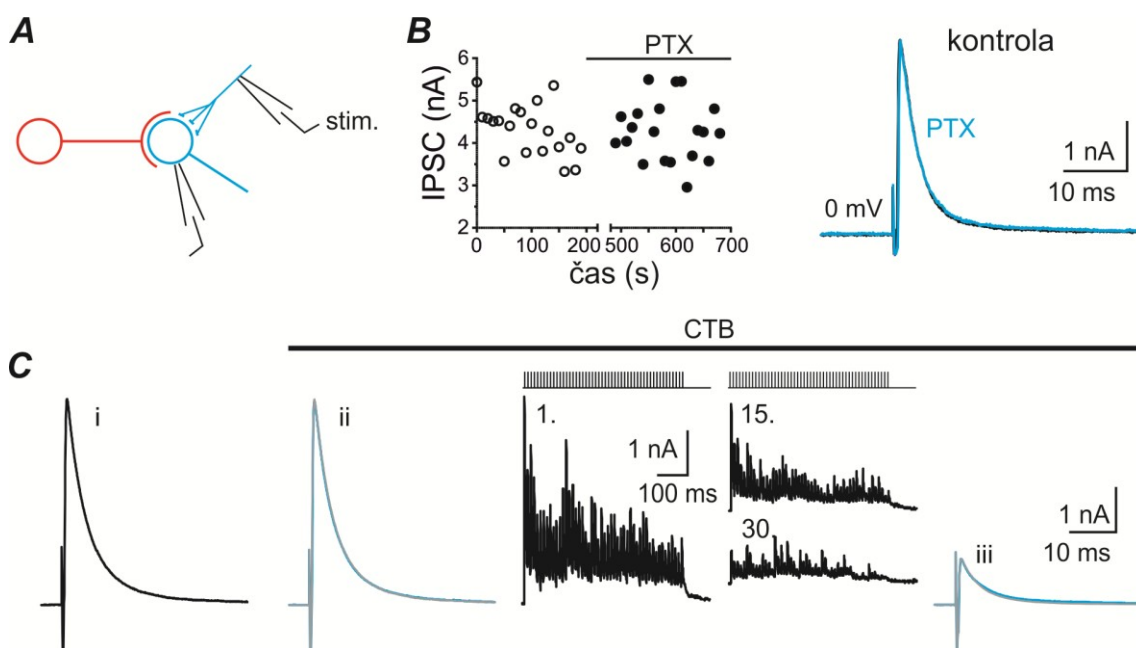
Cílem dalších pokusů bylo ukázat, která z izoform  $\alpha$  podjednotky se účastní na tvorbě postsynaptických GlyR v MNTB. V těchto pokusech jsme použili 5  $\mu$ M kyanotrifenyl borát (CTB), který přednostně blokuje GlyR obsahující podjednotky  $\alpha 1$  (Rundström et al., 1994). Obr. 13 D ukazuje, že CTB urychloval zdánlivou desensitizaci glycinových odpovědí snímaných při membránovém potenciálu +10 mV, přičemž maximální amplituda odpovědí zůstala prakticky neovlivněna. Několik po sobě jdoucích aplikací roztoku obsahujícího CTB a glycin vyvolalo proudové odpovědi, jejichž maximální amplitudy postupně klesaly. Po deseti koaplikacích byla průměrná maximální amplituda redukována na  $26,1 \pm 7,7\%$  kontrolní hodnoty, ( $n = 8$ ,  $p = 0,008$ , Obr. 13 D, F). Inhibice maximální amplitudy byla uvolněna za podmínek, které zahrnovaly hyperpolarizovaný membránový potenciál (-70 mV) a aplikaci glycinu v nepřítomnosti CTB (neukázáno). Toto pozorování je v souladu s use-dependentním a napětově závislým charakterem inhibice  $\alpha 1$  obsahujících GlyR záporně nabitými ionty CTB (tzv. open-channel block) (Zhorov and Bregestovski, 2000).

Přítomnost dalších izoform  $\alpha$  podjednotky byla testována s použitím cyklotihazidu (CTZ; 100  $\mu$ M) a picrotoxininu (PXN; 10  $\mu$ M), u nichž bylo ukázáno, že selektivně blokují GlyR obsahující  $\alpha 2$ , případně  $\alpha 3$  podjednotky (Wang et al., 2007; Yang et al., 2007; Zhang et al., 2008). Amplitudy proudových odpovědí GlyR vyvolané pětisekundovou aplikací glycinu na tělo hlavního neuronu byly jen slabě citlivé k přítomnosti CTZ (kontrola:  $4,4 \pm 1,8$  nA, CTZ:  $3,9 \pm 2,5$  nA,  $n = 6$ ,  $p = 0,378$ , Obr. 13 E, F). To ukazuje, že  $\alpha 2$  podjednotka není významně zastoupena v populaci postsynaptických GlyR na MNTB neuronech. Aplikace PXN také významně neovlivnila amplitudu glycinem vyvolaných proudů, což svědčí proti přítomnosti  $\alpha 3$  podjednotky v postsynaptických receptorech (kontrola:  $3,1 \pm 2,4$  nA, PXN:  $3,1 \pm 2,1$  nA,  $n = 6$ ,  $p = 0,928$ , Obr. 13 F). Podobné výsledky poskytly i imunohistochemické pokusy, které neukázaly specifická značení MNTB neuronů pomocí protilátek rozeznávajících  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$  podjednotky GlyR (viz kapitola 4.1.3). Z toho uzavíráme, že postsynaptické GlyR v MNTB jsou  $\alpha 1\beta$  heteromery.

#### **4.1.2. Synapticky aktivované GlyR v MNTB**

Abychom odhalili případné odlišnosti mezi extrasynaptickými a synapticky aktivovanými GlyR na hlavních neuronech MNTB, testovali jsme citlivost IPSC k látkám

selektivně ovlivňujícím aktivitu jednotlivých podjednotek GlyR. IPSC byly vyvolány nízkofrekvenční stimulací (0,1 Hz) glycinergních vláken při fyziologické teplotě (37°C) a snímány při membránovém potenciálu 0 mV (Obr. 14 A) (Banks and Smith, 1992; Turecek and Trussell, 2001; Awatramani et al., 2004). IPSC byly snímány v aCSF I. Roztok byl obohacen o 10  $\mu$ M DNQX, a 5  $\mu$ M CPP.



**Obr. 14. Synaptické GlyR v MNTB obsahují podjednotky  $\alpha 1$  a  $\beta$ .**

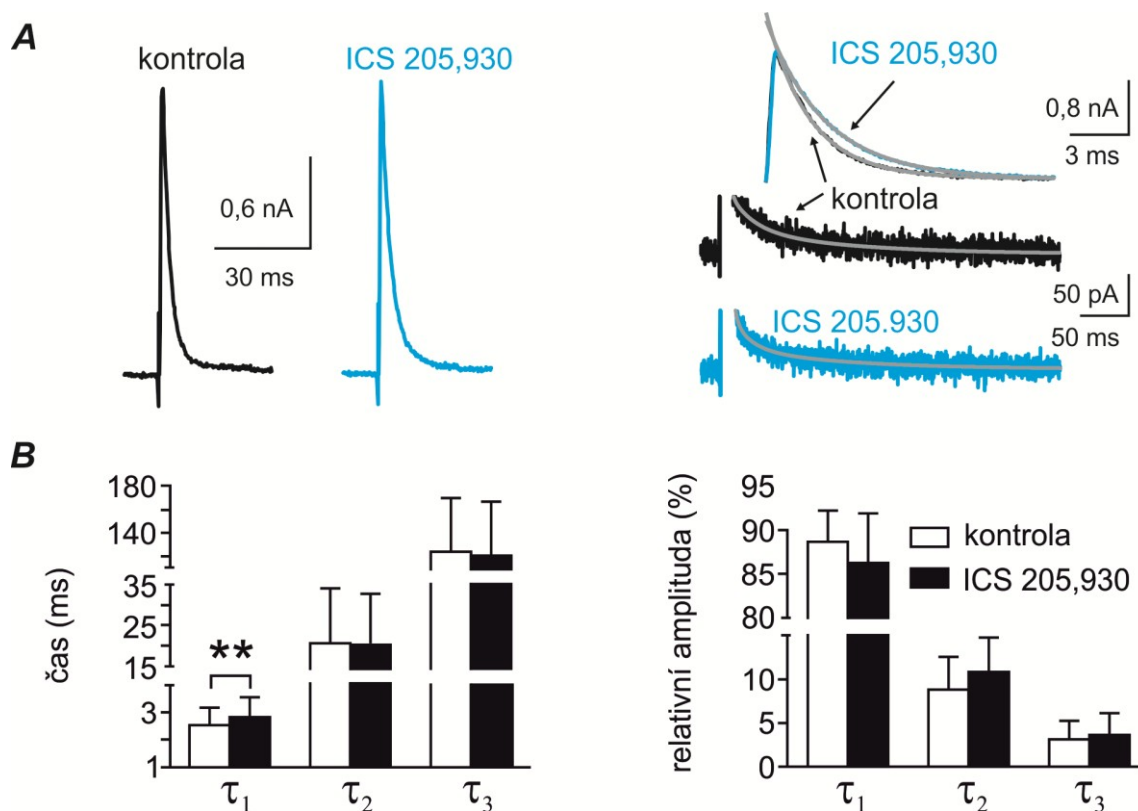
**A**, Schématické znázornění snímání glycinergních IPSC z těl hlavních neuronů MNTB. **B**, Vlevo, Graf znázorňuje maximální amplitudy glycinergních IPSC nasnímaných v nepřítomnosti ( $\circ$ ) nebo v přítomnosti 50  $\mu$ M PTX ( $\bullet$ ). Vpravo, Superpozice reprezentativních záznamů dvou IPSC nasnímaných za kontrolních podmínek (černě) a v přítomnosti 50  $\mu$ M PTX (modře). Oba záznamy vznikly průměrováním 20 jednotlivých IPSC stimulovaných ve frekvenci 0.1 Hz. **C**, Záznamy IPSC pořízené v nepřítomnosti (i) nebo v přítomnosti CTB, před (ii) a po (iii) 30 sériích IPSC (50@100 Hz) vyvolaných ve 20s intervalech. Číslo u série odpovídá jejímu pořadí v průběhu snímání. Superpozice IPSC (i) (šedě) na IPSC (ii) a (iii) (obě modře) ukazují, že CTB významně nemění časový průběh odpovědi synaptických GlyR. Stimulační artefakty byly pro přehlednost u záznamů sérií IPSC odstraněny.

Maximální amplitudy IPSC dosahovaly  $3,0 \pm 2,5$  nA ( $n=28$ ) během  $0,6 \pm 0,2$  ms. Amplitudy IPSC nebyly významně ovlivněny přítomností PTX ( $96,3 \pm 11,9\%$  kontrolní hodnoty,  $n=8$ ,  $p=0,201$ ), podobně jako tomu bylo u glycinem evokovaných odpovědí. To ukazuje na heteromerní skladbu synaptických GlyR (Obr. 14 B). Oproti glycinem vyvolaným

odpovědí, byla maximální amplituda IPSC necitlivá k CTB (Obr. 14 C). To je způsobeno tím, že na rozdíl od farmakologické stimulace trvající 5 s, je synaptická aktivace GlyR pouze krátkodobá a délka trvání otevření chloridového kanálu GlyR je příliš krátká ve srovnání s relativně pomalou vazebnou kinetikou CTB uvnitř póru. Platnost tohoto předpokladu byla ověřována pomocí opakované stimulace IPSC s vysokou frekvencí, která vede k prodloužení doby aktivace synaptických GlyR a k očekávanému zvýšení citlivosti jejich odpovědi k CTB. Obr. 14 C ukazuje výrazné snížení amplitudy jednotlivých IPSC (na  $37,1 \pm 18,4\%$ ,  $n=6$ ,  $p=0,032$ ) snímaných po 30 sériích 50 IPSC stimulovaných s frekvencí 100 Hz v přítomnosti CTB. To znamená, že synapticky aktivované receptory jsou citlivé k CTB a obsahují proto podjednotku  $\alpha 1$ . Časový průběh jednotlivých IPSC nebyl vlivem CTB změněn (Obr. 14 C). Vysokofrekvenční stimulace v nepřítomnosti CTB nevedla k významnému snížení jejich amplitudy ( $-0,4 \pm 16,1\%$ ,  $n=9$ ,  $p=0,980$ ) (není ukázáno). Dále jsme sledovali vliv CTB na amplitudy mIPSC snímaných v aCSF I obsahujícím  $0,5 \mu\text{M}$  TTX. Glycinergní mIPSC byly rozeznány na základě jejich rychlé kinetiky (časová konstanta poklesu  $<4$  ms; (Awatramani et al., 2005a)) a jejich citlivosti ke strychninu ( $0,3 \mu\text{M}$ ). mIPSC byly u každé buňky získány z desetiminutového záznamu před, v průběhu a po perfúzní aplikaci CTB. desetiminutová expozice MNTB neuronů CTB při potenciálu 0 mV vedla k poklesu amplitudy mIPSC ze  $142,3 \pm 8,0$  pA na  $93,2 \pm 22,4$  pA ( $n=4$ ,  $p=0,016$ ). To je v souladu s výsledky získanými pomocí evokovaných IPSC a s přítomností  $\alpha 1$  podjednotky v synaptických GlyR.

ICS205,930, který zvyšuje afinitu heteromerních GlyR, neměl na amplitudy IPSC vyvolaných s nízkou frekvencí významný vliv ( $-1,9 \pm 10,1\%$ ,  $n=6$ ,  $p=0,438$ ) (Obr. 15 A). Tato zdánlivá necitlivost postsynaptických GlyR k ICS205,930 byla pravděpodobně způsobena saturací těchto receptorů při multivesikulárním glycinergním přenosu (viz. Diskuse).

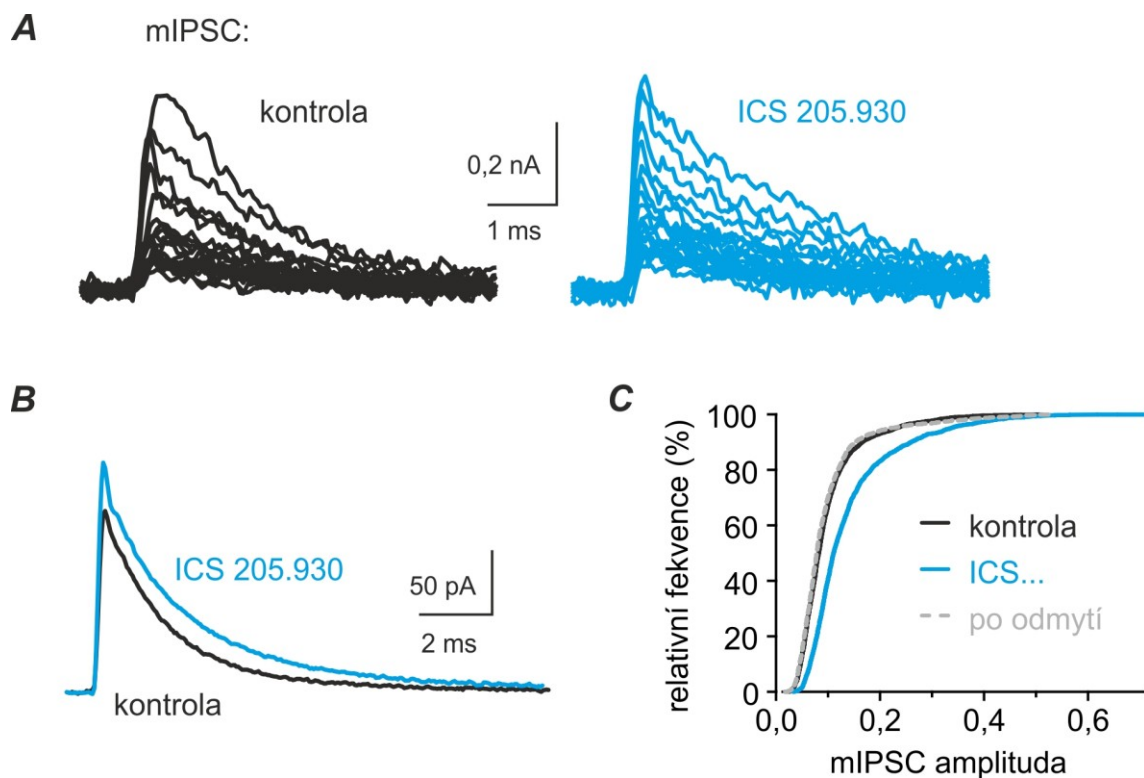




**Obr. 15. Heteromerní složení synaptických GlyR umožňuje fázické IPSC s rychlou kinetikou**

*A*, Vlevo, Záznamy IPSC provedené za kontrolních podmínek a v přítomnosti 1  $\mu$ M ICS205,930 (průměry 20 jednotlivých IPSC stimulovaných ve frekvenci 0,1 Hz). Vpravo, Deaktivační fáze IPSC byla fitována trojitou exponenciální funkcí (šedě). *B*, Časové konstanty (vlevo) a relativní amplitudy (vpravo) jednotlivých exponenciálních funkcí popisujících deaktivaci kontrolních IPSC a IPSC v přítomnosti ICS205,930. Data byla získána ze 6 buněk. (\*\*  $p < 0,01$ , párový  $t$  test).

Několik následujících pozorování však svědčilo o heteromerním složení synaptických GlyR. Za prvé, ICS205,930 reverzibilně zvýšil průměrnou amplitudu spontánních mIPSC ( $124,1 \pm 36,3$  pA) o  $25,0 \pm 10,2\%$  ( $n = 8$ ,  $p = 0,004$ ) (Obr. 16 A, C). Tento vliv interpretujeme tak, že synaptické GlyR nejsou dostatečně saturovány jednotlivými kvanty glycinu a amplitudy jejich odpovědí proto mohou být zvýšeny v přítomnosti látek, které stimulují jejich potenci (Chesnoy-Marchais, 1996, 1999).

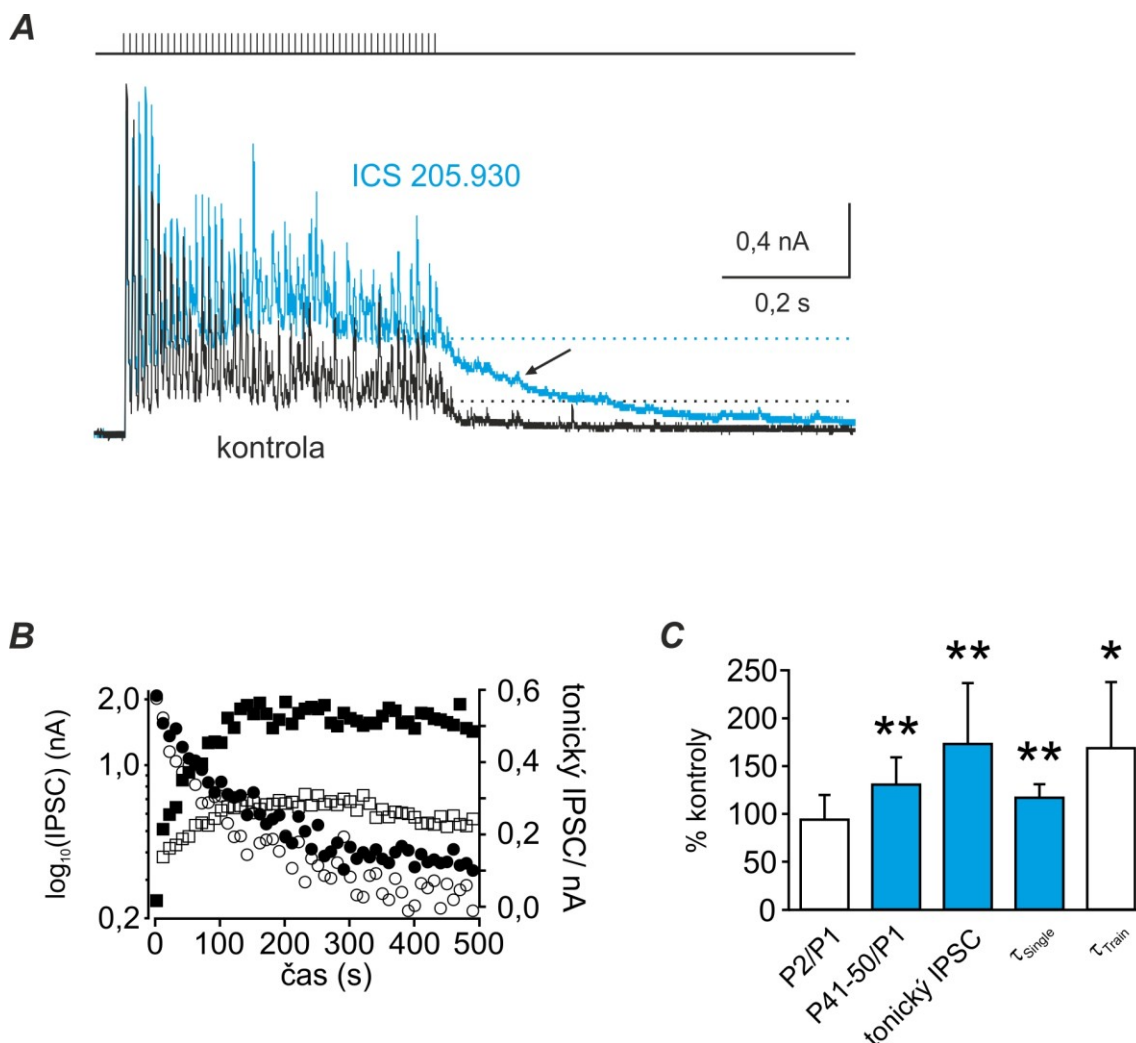


**Obr. 16. ICS205,930 zvyšuje amplitudy miniaturních glycinergních proudů**

*A*, Příklady glycinergních mIPSC nasnímaných z hlavního neuronu v nepřítomnosti (20 mIPSC; černě) a v přítomnosti ICS205,930 (20 mIPSC; modře). *B*, Záznamy vzniklé průměrováním 594 kontrolních mIPSC a 560 mIPSC v přítomnosti ICS205,930 obdržných ze stejné buňky jako je na obrázku *A*. *C*, Normalizované kumulativní distribuce maximálních amplitud mIPSC shromážděných z 8 buněk. Data byla získána z 10 minutových záznamů spontánní aktivity každé z buněk před (černě, 3199 událostí), v průběhu (modrá čára, 2829), nebo 10 min po (přerušovaná šedá čára, 2923 událostí) aplikaci ICS205,930. Distribuce ukazují, že amplitudy mIPSC byly v přítomnosti ICS205,930 reverzibilně zvýšeny ( $p < 0,001$ , Kolmogorov-Smirnov test).

Dále, amplitudy IPSC vyvolaných vysokofrekvenční stimulací byly rovněž ICS205,930 modulovány. Obr. 17 *A* ukazuje příklady sérií 50 IPSC o frekvenci 100 Hz před a při aplikaci ICS205,930. U kontrolních sérií (bez ICS205,930) se amplituda IPSC během opakované stimulace postupně snižovala na  $20,9 \pm 7,9\%$  (průměr amplitud posledních 10 IPSC,  $n = 14$ ). Tento jev se nazývá krátkodobá synaptická deprese (STD) (Regehr, 2012). STD v byla v přítomnosti ICS205,930 snížena, protože amplituda IPSC na konci série byla změněna na  $26,2 \pm 8,3\%$  velikosti prvního IPSC ( $p = 0,002$ ; Obr. 17 *A-C*). Tento efekt je v souladu

s představou, že opakující se IPSC jsou zprostředkovány GlyR nedostatečně saturovanými glycinem, díky poklesu tzv. kvantového obsahu IPSC, a tzv. laterální difúze (Faber and Korn, 1988; Glavinović, 1995). ICS205,930 pak zvýšením afinity GlyR vede k jejich vyšší obsazenosti synaptickým glycinem a k potenciaci jejich odpovědí. Za třetí, ICS205,930 zvyšoval amplitudu tonického IPSC, který vznikal při vysokofrekvenční stimulaci glycinergních vláken. Obr. 17 ukazuje, že v rámci série IPSC vyvolaných s frekvencí 100 Hz nedochází mezi jednotlivými stimuly k úplnému návratu amplitud IPSC na klidové hodnoty a vzniká tak tonický IPSC. Tonický IPSC jsme kvantifikovali tak, že jsme měřili amplitudy proudů těsně předcházejících (1ms před) stimulační artefakty u posledních 10 stimulací série. Zjistili jsme, že ICS205,930 průměrně zvyšoval tonický proud z  $0,6 \pm 0,7$  nA na  $0,9 \pm 0,9$  nA ( $n=11$ ,  $p=0,007$ ) (Obr. 17 A-C). ICS205,930 současně prodlužoval deaktivaci posledního IPSC v sérii (Obr. 17 A,C). Deaktivační fázi jsme fitovali na dvouexponenciální funkci a vypočítali jsme průměrnou amplitudově váženou časovou konstantu ( $\tau_{\text{train}}$ ). Hodnota  $\tau_{\text{train}}$  se v přítomnosti ICS205,930 významně zvýšila z kontrolní hodnoty  $0,2 \pm 0,1$  s na  $0,3 \pm 0,2$  s ( $n=8$ ,  $p=0,017$ ). Vliv ICS205,930 na tonický proud a deaktivaci série IPSC interpretujeme tak, že nízkoafinitní postsynaptické GlyR (Grudzinska et al., 2005) normálně neodpovídají na nízkou koncentraci glycinu nahromaděného v synaptické štěrbině při opakovaném synaptickém přenosu. Výsledkem nízké citlivosti postsynaptických GlyR je malá amplituda tonického IPSC a rychlá deaktivace fázického IPSC po sérii vysokofrekvenčních stimulací snímaných v kontrolních podmínkách. Po zvýšení afinity GlyR v přítomnosti ICS205,930 pak tyto receptory více reagují na nahromaděný glycin zvýšením amplitudy tonického IPSC a prodloužením deaktivace po sérii vysokofrekvenčních IPSC. V souladu s touto představou je menší vliv ICS205,930 na amplitudově-váženou časovou konstantu deaktivace nízkofrekvenčních IPSC (kontrola:  $7,0 \pm 2,3$  ms, ICS205,930:  $8,1 \pm 2,4$  ms,  $n=10$ ,  $p=0,003$ ) (Obr. 17 A,B). Amplitudově vážená konstanta byla získána na základě měření časového průběhu poklesu nízkofrekvenčních IPSC. Exponenciální pokles jsme fitovali třemi exponencielami s použitím Chebysheva algoritmu. Z každé buňky bylo fitováno 20 IPSC a výsledky byly následně zprůměrovány. Kontrolní pokusy ukázaly, že ICS205,930 nevyvolával změnu poměru velikostí amplitud druhého a prvního IPSC (tzv. paired-pulse ratio) v sérii ( $0,8 \pm 0,2$ , na  $0,8 \pm 0,2$ ,  $p=0,321$ ; Obr. 17 C). To naznačuje, že tato látka nepůsobí na presynaptické úrovni. Výsledky tak ukazují, že synapticky aktivované GlyR jsou citlivé k ICS205,930 a podporují závěr, že synaptické GlyR v MNTB jsou  $\alpha 1\beta$  heteromery. Navíc pozorování, že IPSC mají obdobnou citlivost k modulátorům GlyR jako odpovědi vyvolané aplikací glycinu ukazuje, že podjednotková složení extrasynaptických a synaptických GlyR na hlavních neuronech MNTB jsou stejná.

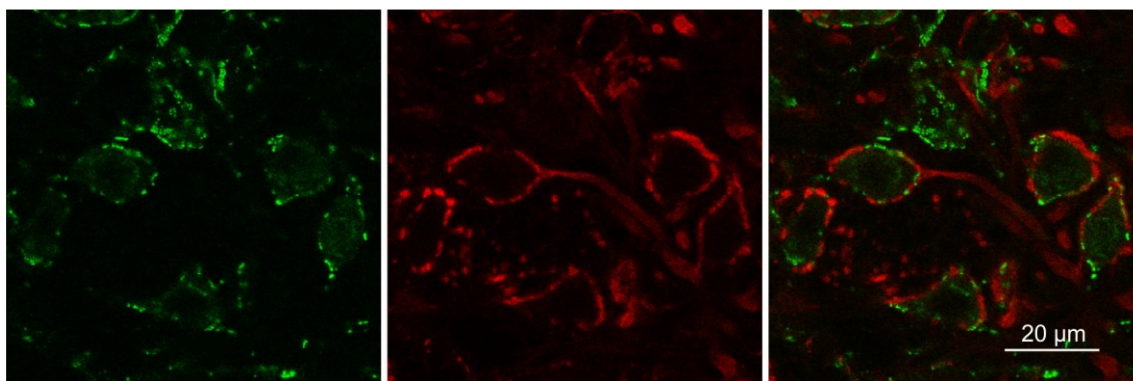


**Obr. 17.** Vliv ICS205,930 na vysokofrekvenční sérii IPSC.

*A*, Obrázek ukazuje série 50 IPSC stimulovaných s frekvencí 100 Hz v nepřítomnosti (kontrola) a v přítomnosti 1  $\mu\text{M}$  ICS205,930. Šipka označuje prodloužení deaktivční fáze série vlivem aplikace ICS205,930. Přerušované čáry ukazují amplitudy tonického IPSC. *B*, ICS205,930 (plné symboly) zvyšoval maximální amplitudy IPSC (čtverce) a amplitudu tonického IPSC (kroužky). Údaje byly získány z buňky na obrázku *A*. *C*, Sloupcový graf shrnuje vlivy ICS205,930 na sérii IPSC. *P* označuje maximální amplitudu IPSC.  $\tau_{\text{single}}$  a  $\tau_{\text{train}}$  představují amplitudově vážené časové konstanty deaktivční fáze nízkofrekvenčních IPSC nebo série IPSC. (\* $p < 0,05$ , či \*\* $p < 0,01$ , párový *t* test).

#### 4.1.3. Lokalizace postsynaptických GlyR v MNTB

Rozmístění postsynaptických GlyR na povrchu hlavních neuronů MNTB bylo studováno s pomocí imunohistochemických metod. Abychom odlišili pre- a postsynaptické struktury v MNTB, značili jsme Heldovy kalichy protilátkami proti kaliceálnímu markeru calretininu (Lohmann and Friauf, 1996; Felmy and Schneggenburger, 2004). GlyR byly značeny myšími primárními protilátkami rozeznávajícími epitop na extracelulární části podjednotky  $\alpha 1$  (Pfeiffer et al., 1984). Barvení zviditelnilo membránově vázané shluky GlyR.  $\alpha 1$  pozitivní shluky se nepřekrývaly s fluorescenčními signály protilátek proti calretininu, což dokládalo jejich rozmístění na somatodendritických částech hlavních neuronů MNTB (Obr. 18). Shluky byly také často uspořádány do růžicovitých útvarů (Obr. 18 A, 19 A), které byly v dřívějších pracích nalezeny u GlyR exprimovaných v jiných oblastech mozku (Alvarez et al., 1997).

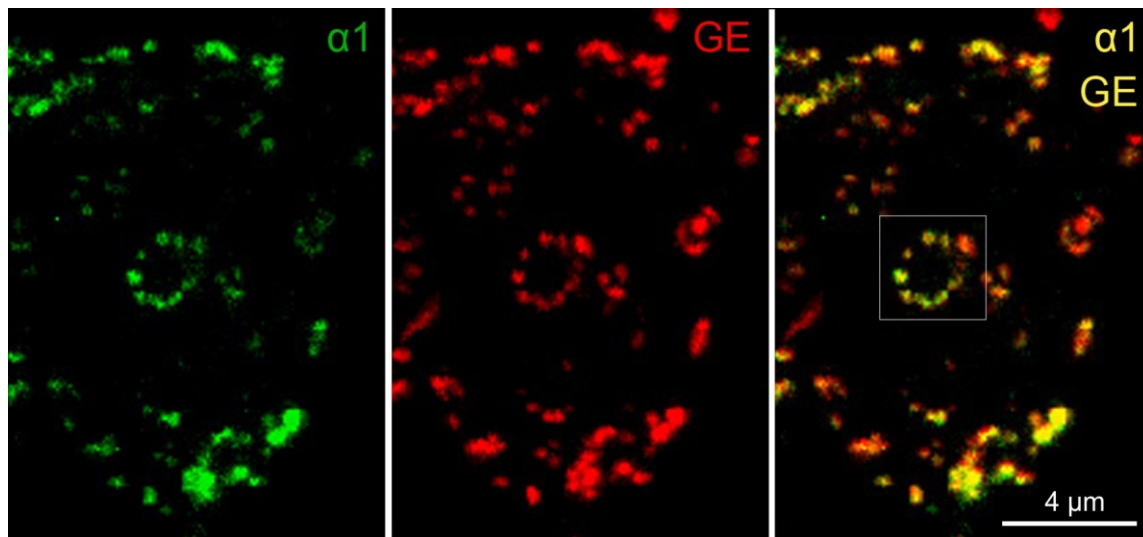


**Obr. 18. Lokalizace  $\alpha 1$  podjednotky GlyR v MNTB potkana**

*Mikrofotografie z konfokálního mikroskopu ukazuje řez MNTB izolovaný z dospělého potkana značený protilátkami proti  $\alpha 1$  podjednotce GlyR (zeleně) a proti calretininu (červeně). GlyR pozitivní signály byly seskupeny do membránově vázaných shluků, což je lokalita typická pro synaptické GlyR.  $\alpha 1$  imunoreaktivní shluky se nepřekrývaly s presynaptickými signály calretininu (vpravo).*

Protilátky proti  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$  podjednotkám GlyR neposkytly specifická značení v MNTB řezech (neukázáno). To bylo v souladu s výsledky našich elektrofyziologických pokusů a svědčilo to o neúčasti  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$  na vytváření GlyR v MNTB. Expres podjednotky  $\beta$  byla zkoumána s použitím protilátek rozeznávajících gefyrin, protein specificky interagující s touto podjednotkou (Kirsch et al., 1991). Značení na gefyrin ukázalo membránově vázané shluky, které byly rozmístěny shodně s  $\alpha 1$  imunopozitivními signály (Obr. 19 B). Naše výsledky jsou

tak v souladu s elektrofyziologickými nálezy a ukazují na přítomnost  $\alpha 1\beta$  heteromerních GlyR na hlavních neuronech MNTB.



**Obr. 19. Shluky synaptických  $\alpha 1$  GlyR jsou kolokalizovány s gephyrinem**

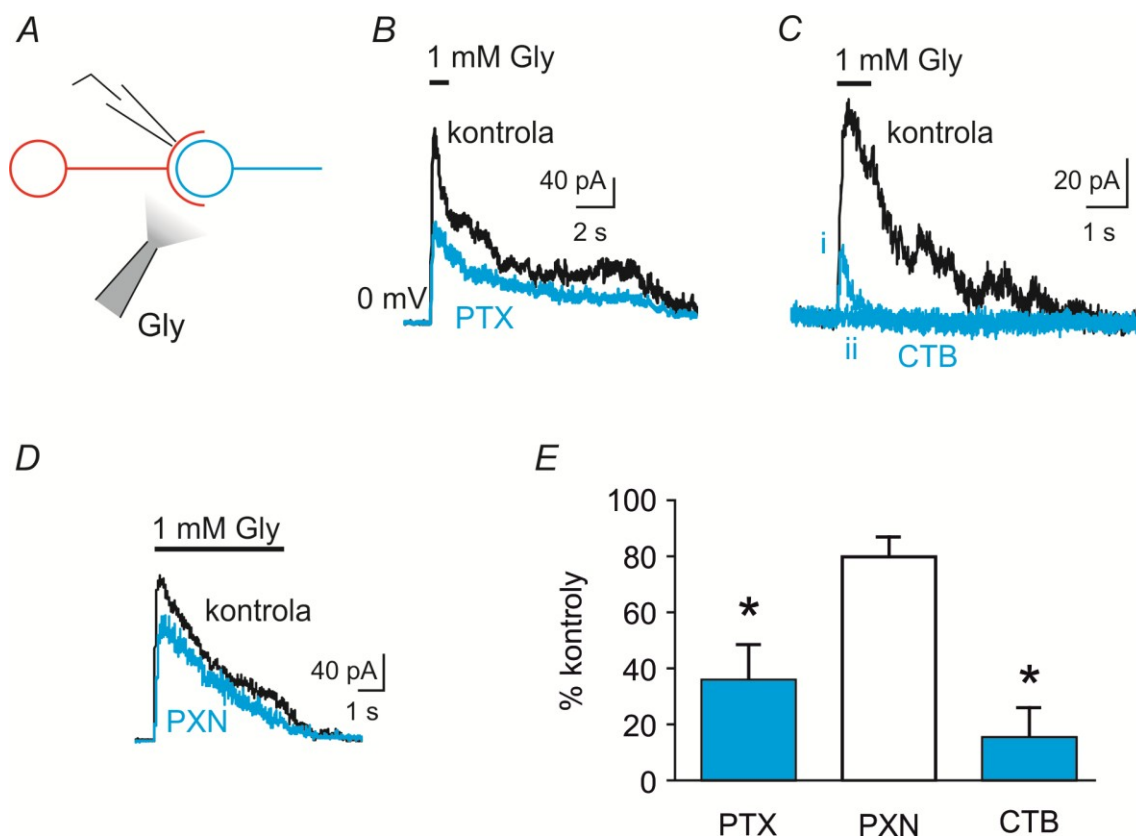
Shluky GlyR označené protilátkami proti  $\alpha 1$  (zeleně) a gephyrinu (červeně). Silný překryv obou fluorescenčních signálů ukazuje na heteromerní složení synaptických GlyR (žlutě). V rámečku je dobře patrné růžicovité uspořádání shluků  $\alpha 1$  podjednotek na tělech hlavních neuronů značící jejich synaptickou lokalizaci.

#### 4.1.4. Presynaptické receptory v MNTB

V další sadě pokusů jsme zjišťovali podjednotková složení GlyR exprimovaných na presynaptických neuronech MNTB synapse tj. na jejich tělech (GBC) uložených ve ventrálním kochleárním jádře a na excitačních terminálech (Heldovy kalichy) kontaktujících hlavní neurony MNTB. Nejprve jsme prováděli presynaptická snímání z celých Heldových kalichů (Turecek and Trussell, 2001) (Obr. 20 A). Na rozdíl od odpovědí postsynaptických GlyR byly glycínem vyvolané proudy snímáné z kalichů ( $0,1 \pm 0,1$  nA, 0 mV,  $n = 20$ ) značně citlivé na PTX (snížení o  $64,2 \pm 12,5\%$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0,016$ ; Obr. 20 B, E). Tato látka snižovala i presynaptické odpovědi nasnímané při -80 mV a to na  $71,4 \pm 15,1\%$  ( $p = 0,005$ ) (neukázáno), což je v souladu s napětově nezávislou inhibicí  $\alpha$  homomerních receptorů PTX (Lynch et al., 1995; Wang et al., 2006; Wang et al., 2007). To ukazuje, že kaliceální GlyR neobsahují podjednotku  $\beta$ . GlyR byly též vysoce citlivé k CTB (Obr. 20 C, E). Už dvě po sobě jdoucí aplikace glycinu v přítomnosti



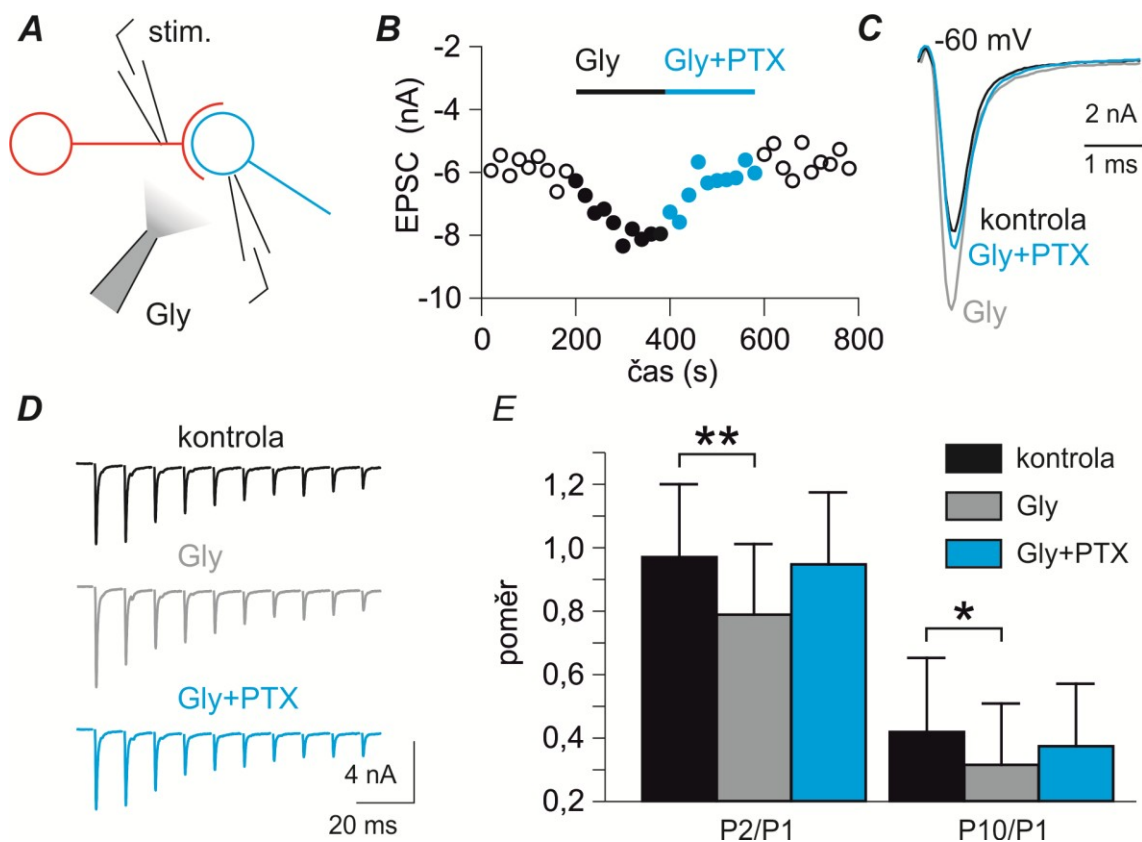
CTB prakticky vedly k eliminaci proudových odpovědí kaliceálních GlyR (kontrola:  $75,1 \pm 49,0$  pA, CTB:  $8,0 \pm 3,3$  pA,  $n=5$ ,  $p=0,041$ ). Na druhou stranu, GlyR vykazovaly velmi malou citlivost k PXN ( $10 \mu\text{M}$ ). Tato látka vyvolala pouze nevýznamné snížení odpovědi o  $20,3 \pm 7,1\%$  ( $n=5$ ,  $p=0,068$ ; Obr. 20 D, E). Z toho je patrné, že Heldovy kalichy obsahují  $\alpha 1$  homomerní GlyR.



**Obr. 20. Heldovy kalichy nesou  $\alpha 1$  homomerní GlyR**

**A**, Schématické znázornění presynaptického snímání glycinem vyvolaných proudů. **B**, Proudové odpovědi kaliceálních GlyR nasnímané v nepřítomnosti (černě) nebo v přítomnosti  $50 \mu\text{M}$  PTX (modře). **C**, Kaliceální odpovědi vyvolané aplikacemi glycinu v 1 min intervalech za kontrolních podmínek a v přítomnosti  $5 \mu\text{M}$  CTB. Dvě po sobě jdoucí aplikace způsobily úplnou inhibici glycinem vyvolaných odpovědí (i, ii). **D**, Příklad odpovědi kaliceálních GlyR nasnímaných v nepřítomnosti nebo v přítomnosti  $10 \mu\text{M}$  PXN. **E**, Souhrnný graf efektů podjednotkově specifických látek na glycinem vyvolané odpovědi obdržené z 18 kalichů, (\* $p < 0.05$ , párový  $t$  test).

Následující série pokusů byla zaměřena na zjištění fyziologického významu námi identifikované populace presynaptických  $\alpha 1$  homomerních GlyR. Testovali jsme jejich schopnost zvýšit výlev glutamátu z Heldova kalichu (Turecek and Trussell, 2001).



**Obr. 21. Presynaptické GlyR moduluji uvolňování glutamátu z Heldova**

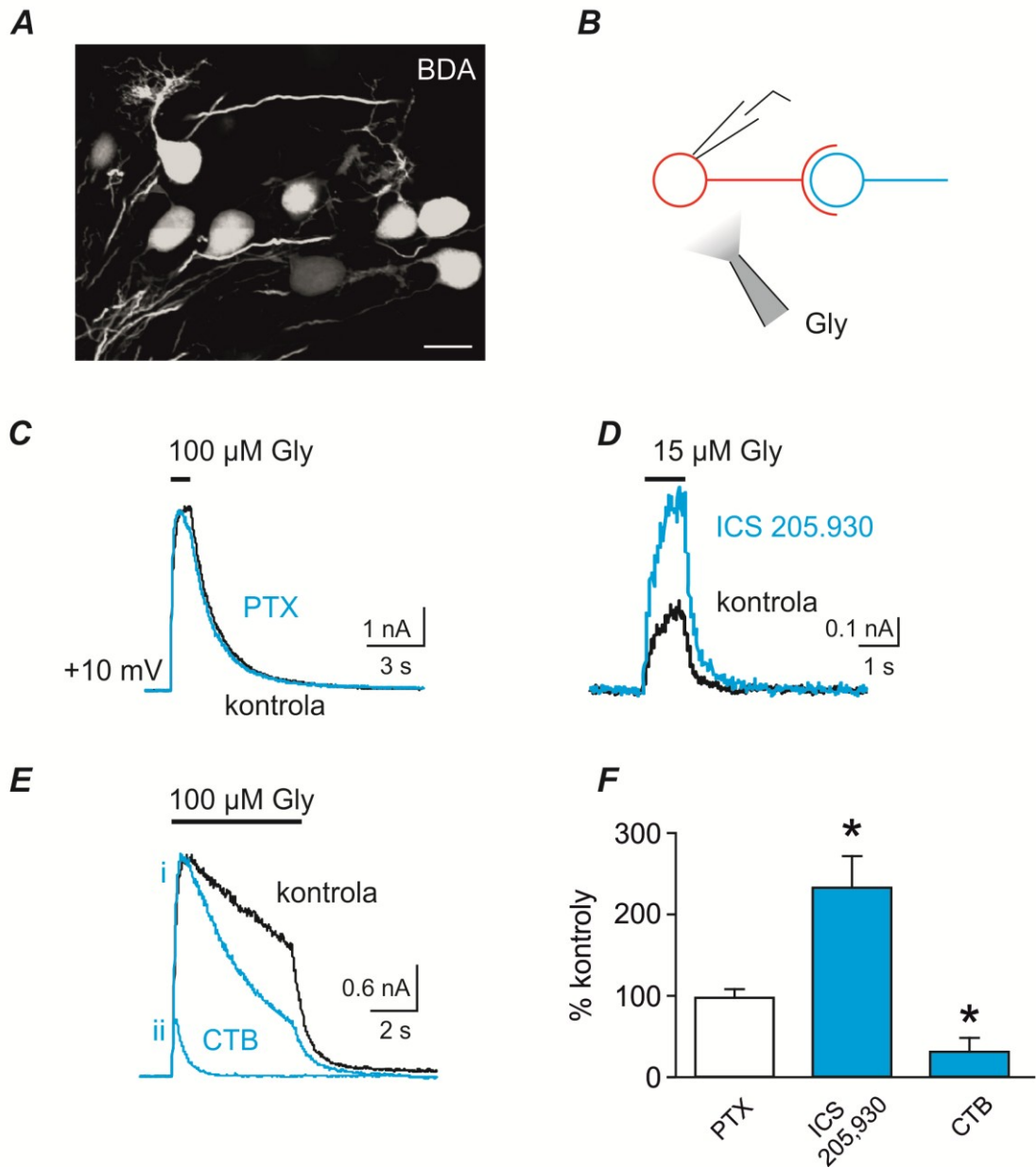
*A*, Schéma ukazující stimulaci a snímání EPSC z hlavních neuronů MNTB. Naměřené maximální amplitudy (*B*) a příklady záznamů (*C*) kontrolních EPSC (○), EPSC nasnímaných v přítomnosti 100  $\mu$ M glycinu (●) či v přítomnosti 100  $\mu$ M glycinu spolu s 50  $\mu$ M PTX (●). EPSC byly vyvolávány ve dvacetisekundových intervalech. *D*, Záznamy sérií EPSC získaných při aplikaci kontrolního roztoku, glycinu nebo glycinu spolu s PTX. Příklady vznikly průměrováním tří sérií EPSC, které byly vyvolány v jednodominutových intervalech. *E*, Graf shrnuje PTX-citlivý vliv glycinu na poměr maximálních amplitud prvního a druhého EPSC (P2/P1) nebo desátého a prvního EPSC (P10/P1). Hodnoty byly získány ze 7 buněk. (\* $p < 0.05$  či \*\* $p < 0.01$ , párový *t* test).

Z hlavních neuronů MNTB udržovaných na -60 mV jsme snímali glutamátergní EPSC vyvolávané buď v intervalech 20 s nebo jako série 10 EPSC o frekvenci 100 Hz (Obr. 21).



Aplikace 100  $\mu$ M glycinu vyvolala postupné zvýšení amplitudy nízkofrekvenčních EPSC o  $31,7 \pm 9,0\%$  ( $n = 7$ ,  $p = 0,003$ ; Obr. 21 B, C). V případě stimulace vysokofrekvenční série EPSC (10@100 Hz), bylo zvýšení amplitudy prvního EPSC v sérii doprovázeno na aktivitě závislým snížením amplitudy následujících EPSC (Obr. 21 D). Tato pozorování jsou v souladu se zvýšením pravděpodobnosti uvolnění glutamátu po aktivaci presynaptických GlyR (Turecek and Trussell, 2001; Awatramani et al., 2005b; Hori and Takahashi, 2009). Popsané modulační efekty glycinu byly výrazně sníženy, pokud byl tento agonista aplikován spolu s 50  $\mu$ M PTX (Obr. 21 B-E). Potenciace nízkofrekvenčních EPSC poklesla na  $12,0 \pm 7,7\%$  ( $p = 0,003$ ) a krátkodobá deprese vysokofrekvenčních EPSC se vrátila na kontrolní hodnoty (bez přítomnosti glycinu) (Obr. 21 D, E). Naše data tak ukazují, že kaliceální  $\alpha$ -homomerní GlyR fungují jako modulátory intenzity excitačního synaptického přenosu.

Poslední sada pokusů této části měla za úkol stanovit podjednotkové složení GlyR exprimovaných na tělech a dendritech GBC uložených ve ventrálním kochleárním jádře. Sledovali jsme glycinem vyvolané proudy z těl GBC při membránovém potenciálu +10 mV (Obr. 22 A, B). Snímání probíhala v promývacím roztoku aCSF II doplněném o 0,5  $\mu$ M TTX, 10  $\mu$ M DNQX a 5  $\mu$ M CPP. Na rozdíl od GlyR přítomných na Heldových kališích, vykazovaly somatodendritické receptory farmakologické vlastnosti typické pro  $\alpha 1\beta$  heteromery. Maximální amplitudy jejich odpovědí nebyly signifikantně ovlivněny PTX (z  $10,9 \pm 3,5$  nA na  $10,5 \pm 3,9$  nA,  $n=6$ ,  $p=0,484$ ; Obr. 22 C), zatímco byly zvýšeny ICS205,930 (z  $1,0 \pm 1,3$  nA na  $2,2 \pm 2,5$  nA,  $n=7$ ,  $p=0,049$ ; Obr. 22 D). Receptory obsahovaly  $\alpha 1$  podjednotku, neboť jejich proudové odpovědi se postupně snížily během 10 po sobě jdoucích společných aplikací glycinu a CTB o  $69,6 \pm 16,9\%$  ( $n = 6$ ,  $p=0,018$ ; Obr. 22 E). CTB neinhiboval odpovědi GlyR při membránovém potenciálu -80 mV (neukázáno). Naše výsledky tak ukazují rozdílné vlastnosti glycinových odpovědí nasnímaných ze somatodendritických částí a z kaliceálních zakončení GBC a dokládají, že GlyR mají na těchto kompartmentech různá podjednotková složení. Somatodendritické receptory jsou heteromery složené z podjednotek  $\alpha 1$  a  $\beta$ , zatímco GlyR přítomné na presynaptických zakončeních jsou tvořeny jako homomery z podjednotek  $\alpha 1$ .



**Obr. 22. Funkční  $\alpha 1/\beta$  heteromerní GlyR na somatodendritických částech GBC**

**A**, Mikrofotografie GBC retrogradně značených pomocí biotinylovaného dextran aminu (BDA). Měřítka odpovídá 20  $\mu\text{m}$ . **B**, Schématické znázornění snímání glycinem vyvolaných proudů z těla GBC. **C, D** Glycinem vyvolané proudy nasnímané z GBC v nepřítomnosti (kontrola) a za přítomnosti 50  $\mu\text{M}$  PTX nebo 1  $\mu\text{M}$  ICS205,930. **E**, Somatické odpovědi GBC vyvolané aplikacemi glycinu v jednodominutových intervalech za kontrolních podmínek a v přítomnosti 5  $\mu\text{M}$  CTB (i, ii označují první a desátou odpověď při kombinované aplikaci glycinu s CTB). **F**, Souhrn efektů podjednotkově

*specifických látek na glycinem vyvolané proudy. Výsledky byly shromážděny z pokusů na 19 buňkách, (\* $p < 0.05$ , párový  $t$  test).*

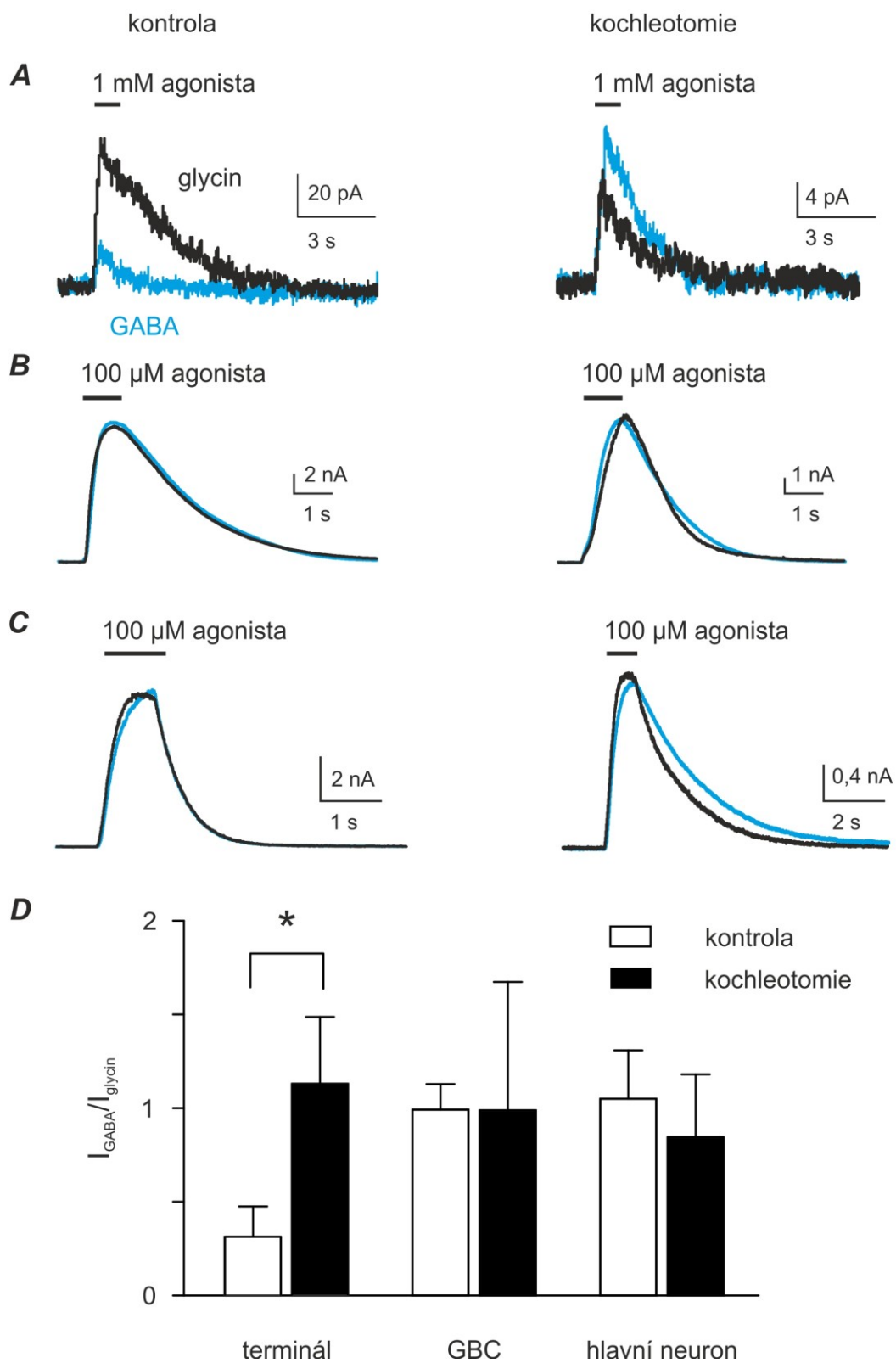
## **4.2. Vliv kochleární aktivity na vývojové změny inhibičního systému v MNTB**

Inhibiční systém mozkového kmene savců prodělává během raného postnatálního vývoje velmi významné změny (Kandler and Gillespie, 2005). Součástí hlavních změn, k nimž u potkana dochází během prvních 2-3 týdnů věku, je náhrada inhibičních GABA<sub>A</sub> receptorů za GlyR a inhibičního přenašeče GABA za glycin. (Kotak et al., 1998; Turecek and Trussell, 2002; Nabekura et al., 2004; Awatramani et al., 2005a). V rámci MNTB bylo ukázáno, že kaliceální GABA<sub>A</sub> receptory jsou během druhého postnatálního týdne nahrazeny GlyR, zatímco na tělech hlavních neuronů dochází k výraznému nárůstu povrchové exprese GlyR, ale množství GABA<sub>A</sub> receptorů zůstává zachováno (Turecek and Trussell, 2002; Awatramani et al., 2005a).

Vzhledem k tomu, že k uvedeným vývojovým změnám dochází v období kolem nástupu slyšení (~P11), je možné, že by mohly být vyvolány faktory souvisejícími se zahájením příjmu sluchových podnětů. Podstatou následujících pokusů bylo zabránění přirozené kochleární aktivitě a zkoumání poměrného zastoupení GABA<sub>A</sub> receptorů a GlyR na neuronech MNTB. Provedli jsme oboustranné kochleární ablace u potkaních mláďat ve věku před nástupem slyšení (P5-P6). Poté, co kochleotomizovaní potkani dosáhli věku P13-P15, jsme snímali proudy vyvolané aplikací GABA nebo glycinu na pre- a postsynaptické buňky v MNTB. Snímání probíhalo v promývacím roztoku aCSF II doplněném o 0,5  $\mu$ M TTX, 10  $\mu$ M DNQX a 5  $\mu$ M CPP.

Výsledky ukázaly, že kochleotomie vedla ke zvýšení poměru maximálních amplitud odpovědí GABA<sub>A</sub> receptorů a GlyR na kaliceálních zakončeních z kontrolní hodnoty  $0,4 \pm 0,3$  na  $1,1 \pm 0,4$  ( $n = 18$ ,  $p = 0,0004$ ) (Obr. 23A, D). U zvířat po kochleotomii proto přetrvávala zvýšená exprese presynaptických GABA<sub>A</sub> receptorů. Na rozdíl od kaliceálních receptorů neměla kochleotomie významný vliv na složení inhibičních receptorů na somatodendritických částech GBC v AVCN (poměr amplitud odpovědí GABA<sub>A</sub> a GlyR byl  $1,0 \pm 0,1$  u kontrol a  $1,4 \pm 1,5$  u kochleotomizovaných zvířat,  $n = 16$ ,  $p = 0,51$ ) a hlavních neuronů v MNTB ( $1,1 \pm 0,3$  a  $0,9 \pm 0,3$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0,33$ ) (Obr. 23). Celková množství inhibičních receptorů exprimovaných těmito buňkami však byla u zvířat po kochleotomii významně snížena. To bylo patrné ze snížení hustoty proudových odpovědí vyvolaných aplikací

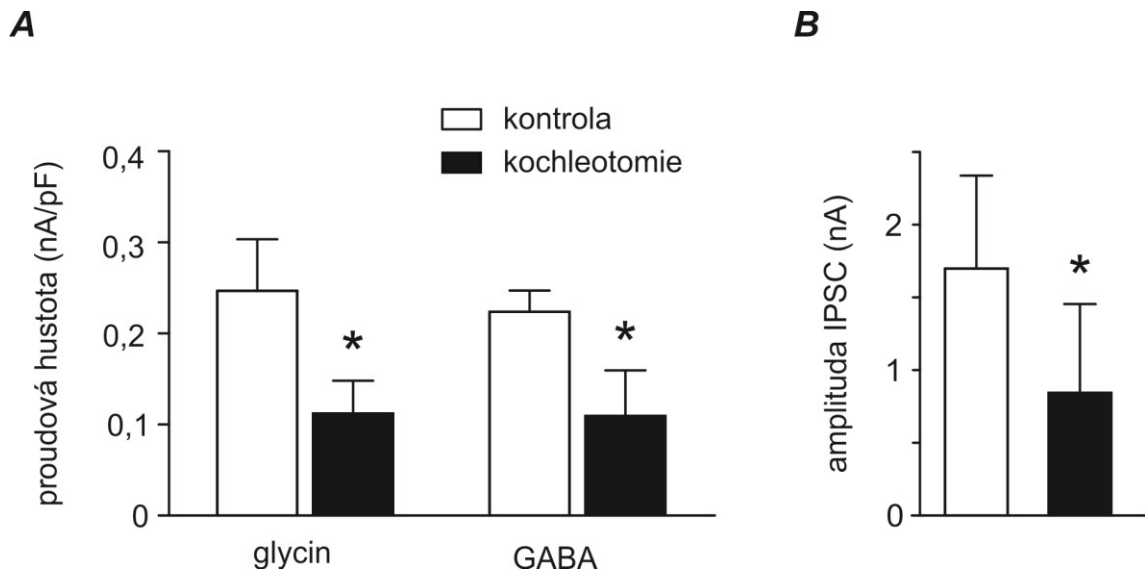
glycinu a GABA na těla hlavních neuronů v řezech MNTB z kochleotomizovaných zvířat (Obr. 24 A).



**Obr. 23. Bilaterální kochleotomie zabrání vývojovému přepnutí  $GABA_A$  na glycinové receptory na Heldově kalichu**

**A**, Proudové odpovědi Heldova kalichu na 1s aplikace 1 mM GABA či glycinu u kontrolních zvířat (vlevo) a u zvířat po oboustranné kochleotomii (vpravo). **B**, Odpovědi vyvolané 1s aplikací 100  $\mu$ M GABA či glycinu na těla GBC v řezech AVCN izolovaných z kontrolních zvířat a ze zvířat po kochleotomii. **C**, Odpovědi hlavních neuronů MNTB vyvolané 1s aplikací 100  $\mu$ M GABA či glycinu. **D**, Souhrnný graf vlivu kochleotomie na poměr velikostí GABA a glycinových odpovědí snímaných z Heldova kalichu (terminál), těl GBC a těl hlavních neuronů. Významný efekt kochleotomie se projevil pouze u Heldova kalichu ( $n = 18$  pro terminál,  $n = 16$  pro GBC,  $n = 10$  pro hlavní neuron  $*p < 0.05$ ,  $t$  test).

Amplitudy IPSC snímaných v roztoku aCSF I obsahujícím navíc 10  $\mu$ M DNQX a 5  $\mu$ M CPP vykazovaly u neuronů z MNTB po kochleotomii podobná snížení (Obr. 24 B). To naznačilo, že přerušení kochleární aktivity má vliv na expresi jak extrasynaptických tak i synaptických inhibičních receptorů.



**Obr. 24. Snížení exprese receptorů pro GABA a glycin u hlavních neuronů MNTB po kochleotomii**

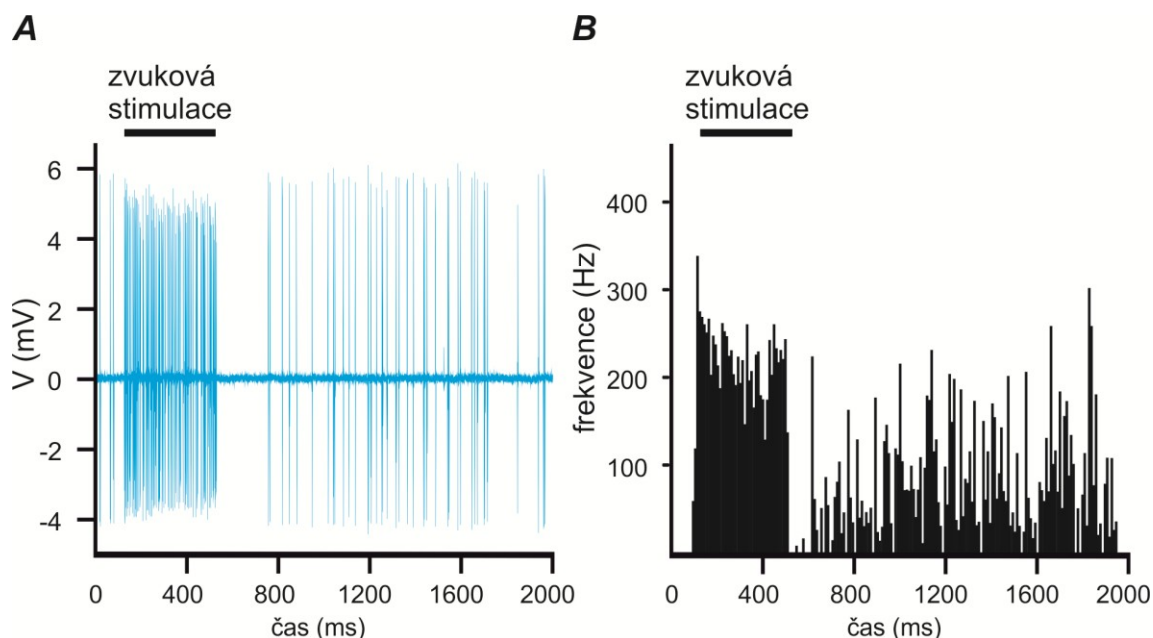
**A**, Průměrné hustoty proudových odpovědí GlyR a  $GABA_A$  receptorů na hlavních neuronech MNTB byly významně sníženy u zvířat podrobených oboustranné kochleotomii ( $n = 6$  pro GlyR a  $n = 6$  pro  $GABA_A$  receptor,  $(*p < 0.05$ , párový  $t$  test). **B**, Sloupcový graf ukazuje vliv kochleotomie na velikost

*odpovědi synapticky aktivovaných inhibičních receptorů u hlavních neuronů MNTB ( $n = 15$ ,  $*p < 0.05$ , párový  $t$  test).*

U kochleotomizovaných zvířat jsme rovněž zjistili, že antagonist GlyR ( $0,3 \mu\text{M}$  strychnin) inhiboval amplitudy IPSC na  $17,5 \pm 3,3\%$  kontrolní hodnoty ( $n = 4$ ). Deaktivační fáze IPSC byla také prodloužena. Exponenciální pokles IPSC jsme fitovali třemi exponenciálami za použití Chebyshevova algoritmu. Souhrnná amplitudově vážená časová konstanta poklesu IPSC vzrostla z  $6,8 \pm 2,5$  ms u kontrol na  $16,9 \pm 10,9$  ms ( $p = 0,049$ ,  $n = 15$ ) u zvířat po kochleotomii. Tato pozorování naznačila, že kochleotomie způsobila, že část inhibičních vláken si podržela GABAergní charakter i po nástupu slyšení, přičemž u kontrolních zvířat jsou téměř všechna inhibiční vlákna glycinergní (Awatramani et al., 2005a). Naše výsledky tak prokázaly významný vliv kochleární aktivity na inhibiční systém v MNTB a naznačily, že senzorická stimulace může hrát roli v procesech spouštějících vývojově závislý přechod od GABAergního ke glycinergnímu charakteru inhibičních vláken v MNTB.

#### **4.3. Modulační vliv GABA<sub>B</sub> receptorů na aktivitu neuronů myšího MNTB *in vivo***

V klasickém pojetí byla obří Heldova synapse považována za relé, které s vysokou spolehlivostí přepíná excitaci přicházející z AVCN na inhibiční signály posílané do dalších jader SOC (Borst and Soria van Hoeve, 2012). Některé práce však také ukázaly, že spolehlivost této synapse *in vivo* je nižší než 100% a přiváděné vstupní signály nemusí být vždy následovány výstupními v poměru 1:1 (Lorteije et al., 2009). To vedlo k předpokladu, že přenos na Heldově synapsi je pod kontrolou inhibičního systému. Glutamátergní přenos v MNTB je ovlivňován více způsoby. Jeden z mechanismů regulace je zprostředkován presynaptickými GABA<sub>B</sub> receptory. Bylo ukázáno, že farmakologická aktivace GABA<sub>B</sub> receptorů v řezech MNTB snižuje uvolňování glutamátu z Heldova kalichu inhibicí presynaptických VGCC (Barnes-Davies and Forsythe, 1995; Isaacson, 1998; Takahashi et al., 1998). Zda se tento mechanismus uplatňuje při modulaci zvukem vyvolané aktivity neuronů MNTB *in vivo*, však nebylo doposud objasněno. Rovněž není znám endogenní zdroj agonistů presynaptických GABA<sub>B</sub> v MNTB a kinetika jejich aktivace *in vivo*.



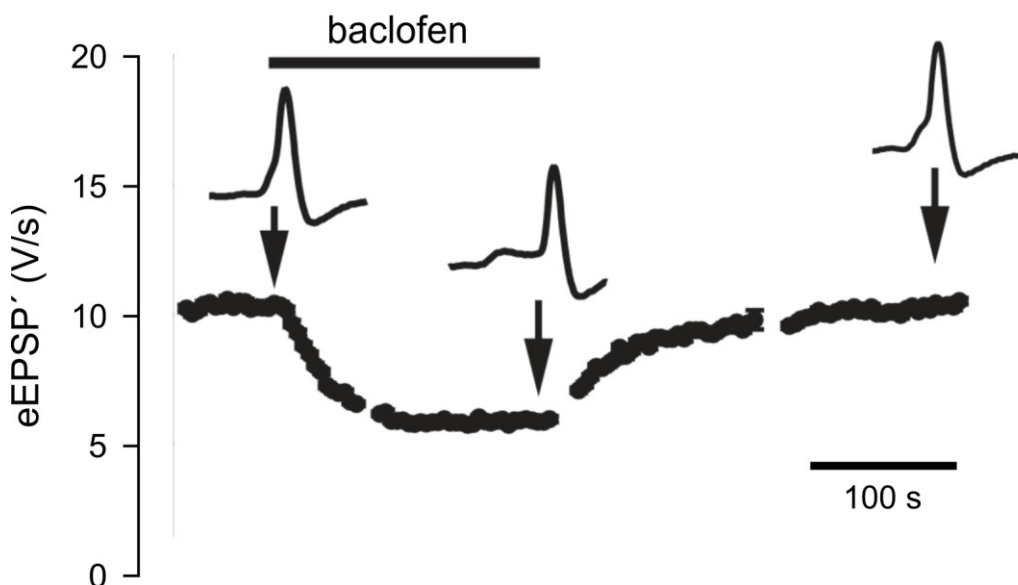
**Obr. 25. Spontánní a zvukem vyvolaná aktivita hlavního neuronu MNTB**

*A*, Typický příklad odpovědi hlavního neuronu MNTB získaný juxtacelulárním snímáním *in vivo*. Obrázek ukazuje zvýšení aktivity neuronu vyvolané 400 ms trvající zvukovou stimulací (širokopásmový šum 80 dB). Ukončení zvukové stimulace způsobilo krátkodobé potlačení neuronální aktivity. *B*, Peristimulační časový histogram aktivity neuronu z panelu *A*. Histogram byl sestaven na základě pěti po sobě jdoucích záznamů spontánní a zvukem vyvolané aktivity.

#### 4.3.1. Regulace aktivity MNTB neuronů farmakologicky aktivovanými GABA<sub>B</sub> receptory

První část pokusů byla zaměřena na testování přítomnosti GABA<sub>B</sub> receptorem zprostředkovaného modulačního mechanismu v MNTB *in vivo*. Zkoumali jsme vliv baclofenu, selektivního agonisty GABA<sub>B</sub> receptoru, na spontánní a zvukem vyvolanou aktivitu neuronů pravostranného MNTB u mladých dospělých zvířat s dokončeným vývojem. Napěťové odpovědi jednotlivých neuronů byly snímány juxtacelulárně a byly v záznamech identifikovány na základě charakteristického časového průběhu (Lorteije et al., 2009) (Obr. 27 *A*). V nepřítomnosti zvukové stimulace vykazovaly neurony komplexní spontánní aktivitu, přičemž frekvence spontánních AP činila průměrně  $31 \pm 32$  Hz ( $n = 21$ ). Kontralaterální akustická stimulace 400 ms dlouhými úseky širokopásmového šumu (2-40 kHz; 80 dB SPL) vyvolávala výrazné zvýšení aktivity neuronů na frekvenci  $335 \pm 55$  Hz ( $n = 21$ ), měřené během prvních 10 ms a průměrnou aktivitou  $186 \pm 46$  Hz během posledních 50 ms zvukového stimulu. Krátce

po ukončení zvukové stimulace došlo často ke krátkodobému poklesu spontánní aktivity (Obr. 25 A). V záznamech jsme následně zjišťovali poměrná zastoupení podprahových odpovědí jakožto míry spolehlivosti přenosu na Heldově synapsi. Zjistili jsme, že z celkového počtu 21 analyzovaných buněk vykazovalo 6 buněk  $5,2 \pm 7,4\%$  selhání během spontánní aktivity a 9 buněk  $7,7 \pm 8,4\%$  selhání během zvukem vyvolané aktivity.

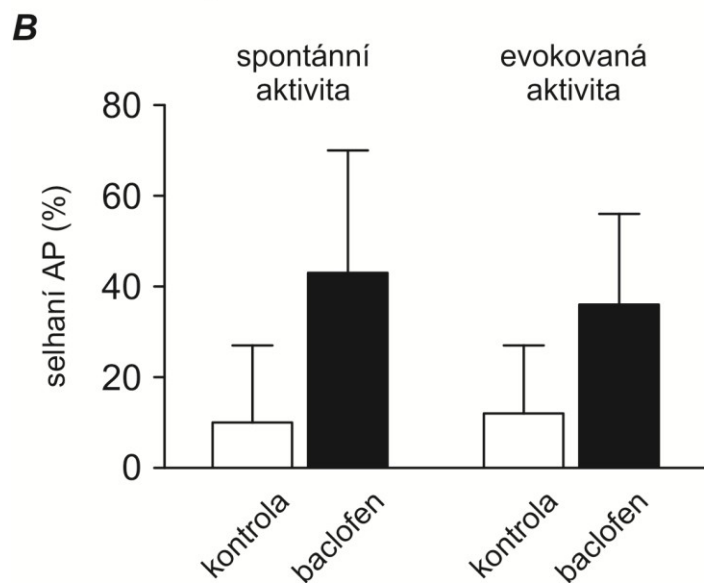
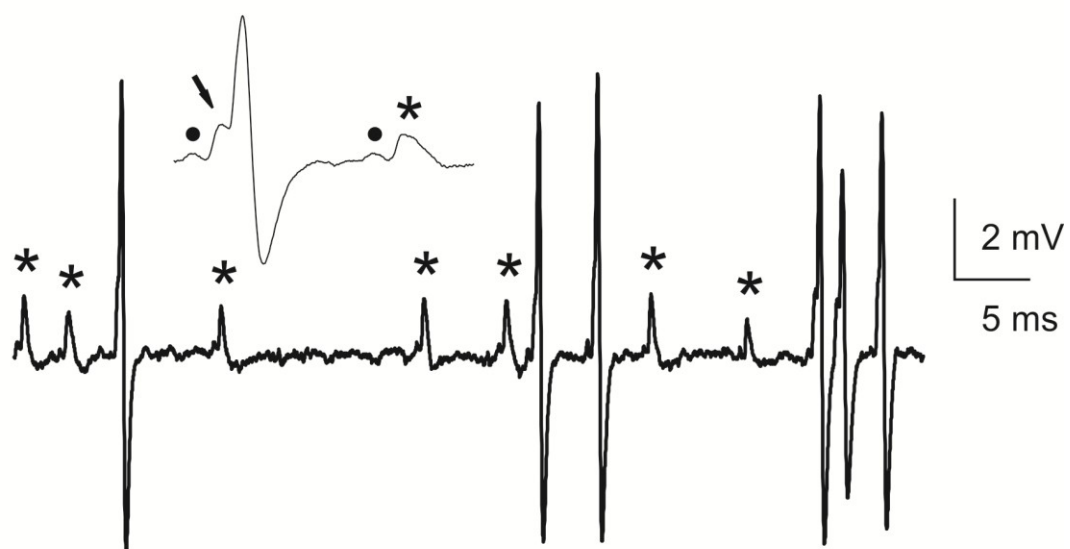


**Obr. 26. Změny aktivity neuronu MNTB během iontoforetické aplikace baclofenu**

Obrázek ukazuje vliv iontoforetické aplikace 10 mM baclofenu na spontánní neuronální aktivitu v MNTB. Aplikace trvala 185 s a byl pro ni použit ejekční proud -200 nA.

V další části pokusů jsme snímali spontánní a zvukem vyvolanou aktivitu v přítomnosti baclofenu. V pilotních pokusech jsme nejprve testovali způsob jeho aplikace pomocí perfúzního systému na ventrální povrch mozkového kmene. Tato metoda vedla k ovlivnění aktivity neuronů, ale neumožňovala odhadnout koncentraci baclofenu v cílové struktuře a zhoršovala stabilitu snímání. Upřednostnili jsme proto iontoforetickou aplikaci pomocí vícekanálové kapiláry umístěné do těsné blízkosti snímací elektrody (Havey and Caspary, 1980) (viz Metody). Koncentrace baclofenu v kapiláře (10 mM) byla zvolena tak, aby látka po aplikaci saturovala GABA<sub>B</sub> vazebná místa na neuronech MNTB (Wang et al., 2013). Obr. 26 ukazuje časový průběh nástupu a odeznívání baclofenem vyvolané inhibice neuronální aktivity v MNTB. Amplitudy extracelulárně snímaných EPSP (eEPSP) vykazovaly první známky poklesu během 30 s a maximální inhibice bylo dosaženo zpravidla po 2 min od začátku aplikace. Po ukončení aplikace odezníval inhibiční efekt baclofenu po dobu asi tří minut.





**Obr. 27. Aktivace GABA<sub>B</sub> receptoru snižuje spolehlivost přenosu na Heldově synapsi in vivo**

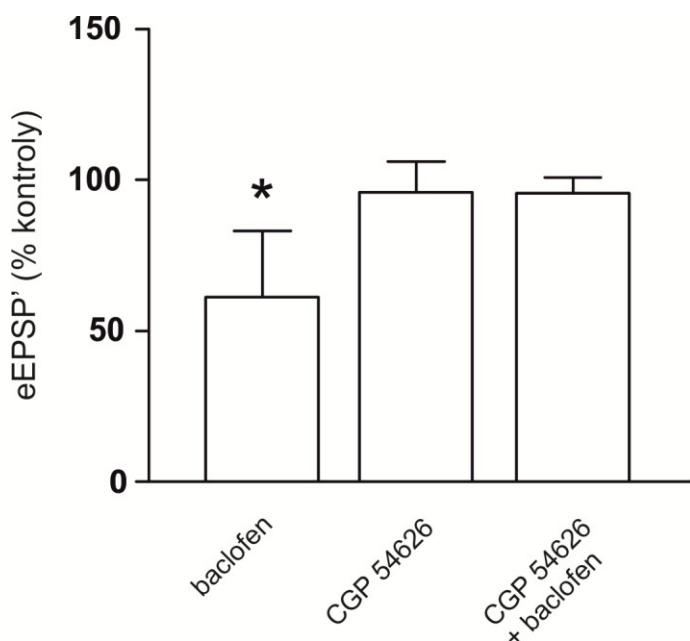
*A, Příklad juxtacelulárně snímané spontánní aktivity hlavního neuronu MNTB za kontrolních podmínek (nahore) a v přítomnosti baclofenu (dole). Baclofen vyvolal zvýšení četnosti selhání a prodloužení nástupu postsynaptických AP, což je patrné z výraznější inflexe mezi eEPSP a extracelulárně snímaného AP (eAP). Vložené obrázky ukazují na rozšířené časové škále podprahové (hvězdička) nebo nadprahové EPSP (šipka) a kapacitně přenesené presynaptické AP (plný kulatý symbol). B, Sloupcový graf shrnuje vliv baclofenu na frekvenci selhání AP u spontánní a zvukem vyvolané aktivity. Hodnoty byly získány ze 6 buněk. (\* $p < 0.05$ , párový  $t$  test).*

Z důvodu časté nevýrazné inflexe mezi eEPSP a následujícím extracelulárně snímaným akčním potenciálem (eAP), nebyly maximální amplitudy eEPSP vždy jednoznačně identifikovatelné. Kvantitativní analýza aktivity byla proto provedena měřením maximální rychlosti růstu (první derivací) vzestupné fáze (eEPSP') (viz Metody). Dřívější práce ukázaly, že amplitudy extracelulárně snímaných EPSP korelují s hodnotami eEPSP' a dobře charakterizují aktuální sílu synaptického přenosu (Lorteije et al., 2009). Baclofen snižoval eEPSP' v průměru na  $61 \pm 22\%$  ( $n = 6$ ) kontrolní hodnoty (Obr. 28), což bylo provázeno zvýšením frekvence selhání AP jak u spontánní ( $z 10 \pm 17\%$  na  $43 \pm 27\%$ ,  $p = 0,03$ ), tak u zvukem vyvolané aktivity ( $z 12 \pm 15\%$  na  $36 \pm 20\%$ ,  $p = 0,03$ ) (Obr. 27 B). Rozdíly ve vlivu baclofenu na spontánní a zvukem vyvolanou aktivitu nebyly signifikantní. Baclofen rovněž neměnil časový průběh eAP, což naznačilo, že jeho hlavní vliv, je zprostředkován presynaptickými GABA<sub>B</sub> receptory. To bylo potvrzeno i pozorováním, že baclofen zvýšil poměr hodnot dvou po sobě jdoucích eEPSP' (paired-pulse ratio) z  $1,3 \pm 0,2$  na  $1,4 \pm 0,1$  ( $n = 6$ ,  $p = 0,047$ ). Tyto výsledky ukázaly, že GABA<sub>B</sub> receptory na Heldově synapsi regulují krátkodobou synaptickou plasticitu snižováním pravděpodobnosti uvolnění synaptických váček schopných okamžitého uvolnění.

#### **4.3.2. Sledování tonické přítomnosti GABA v MNTB in vivo**

Naše pokusy vedly k pozorování přibližně 40% inhibice amplitudy EPSP vlivem baclofenu aplikovaného na Heldovu synapsi in vivo. Dřívější práce provedené na živých řezech MNTB však ukázaly podstatně vyšší míru inhibice EPSC (až 90%) (Barnes-Davies and Forsythe, 1995; Isaacson, 1998; Takahashi et al., 1998). To naznačuje, že presynaptické GABA<sub>B</sub> receptory, které se vyznačují relativně vysokou afinitou k agonistům (Takahashi et al., 1998), by mohly být v MNTB tonicky aktivovány zbytkovou koncentrací GABA. V našich dalších pokusech jsme proto testovali, zda selektivní antagonist GABA<sub>B</sub> receptoru, CGP54626, ovlivňuje spontánní aktivitu hlavních neuronů v MNTB. Nejprve jsme aplikovali tuto látku na povrch mozku lokálním perfúzním systémem. Jedná se o vysokoafinitního antagonistu

GABA ( $K_D$  je 1,5 nM) na  $GABA_B$  receptoru (Green et al., 2000; Mukherjee et al., 2006), ale ani velmi vysoké koncentrace CGP54626 (1 mM) neovlivnily hodnoty eEPSP' (u šesti různých zvířat). Následně jsme použili lokální iontoforetickou aplikaci vícekanálovou kapilárou umístěnou v blízkosti snímací elektrody. Koncentrace CGP54626 v aplikační kapiláře byla 1 mM. Hodnoty eEPSP' vykazovaly během aplikace CGP54626 pouze nevýznamné snížení o  $4,0 \pm 10,0\%$  ( $n = 6$ ,  $p = 0,34$ ). V kontrolních pokusech byl CGP54626 aplikován společně baclofenem. Očekávali jsme, že snížení inhibičního vlivu baclofenu v přítomnosti kompetitivního antagonisty bude důkazem úspěšné aplikace CGP54626 do struktur MNTB. Zjistili jsme, že zatímco samotný baclofen (10 mM) snižoval eEPSP' o  $61 \pm 17\%$  ( $n = 6$ ), následná kombinace 10 mM baclofenu s 1 mM CGP54626 vedla k návratu inhibice na  $4,0 \pm 7,0\%$  ( $n = 5$ ,  $p = 0,4$ ) (Obr. 28). Toto pozorování bylo v souladu s kompetitivním chováním CGP54626 na  $GABA_B$  a jasně ukázalo, že tento antagonist dosahoval účinných koncentrací v blízkosti sledované Heldovy synapse.



**Obr. 28. Modulační vliv CGP54626 je vázán na přítomnost exogenních agonistů  $GABA_B$  receptorů**

Sloupcový graf ukazuje relativní změny eEPSP' vyvolané aplikacemi agonistů (baclofen), antagonistů (CGP54626) nebo současnou aplikací obou typu modulátorů. Data byla získána ze 17 neuronů. (\* $p < 0.05$ ,  $t$  test).

Naše pokusy tak prokazují existenci GABA<sub>B</sub> receptory zprostředkovaného mechanismu modulace excitačního synaptického přenosu v MNTB *in vivo* a naznačují, že GABA<sub>B</sub> receptory nevykazují *in vivo* významnou konstitutivní aktivitu.

#### **4.4. Modulace excitačního synaptického přenosu v MNTB postsynaptickými GABA<sub>B</sub> receptory**

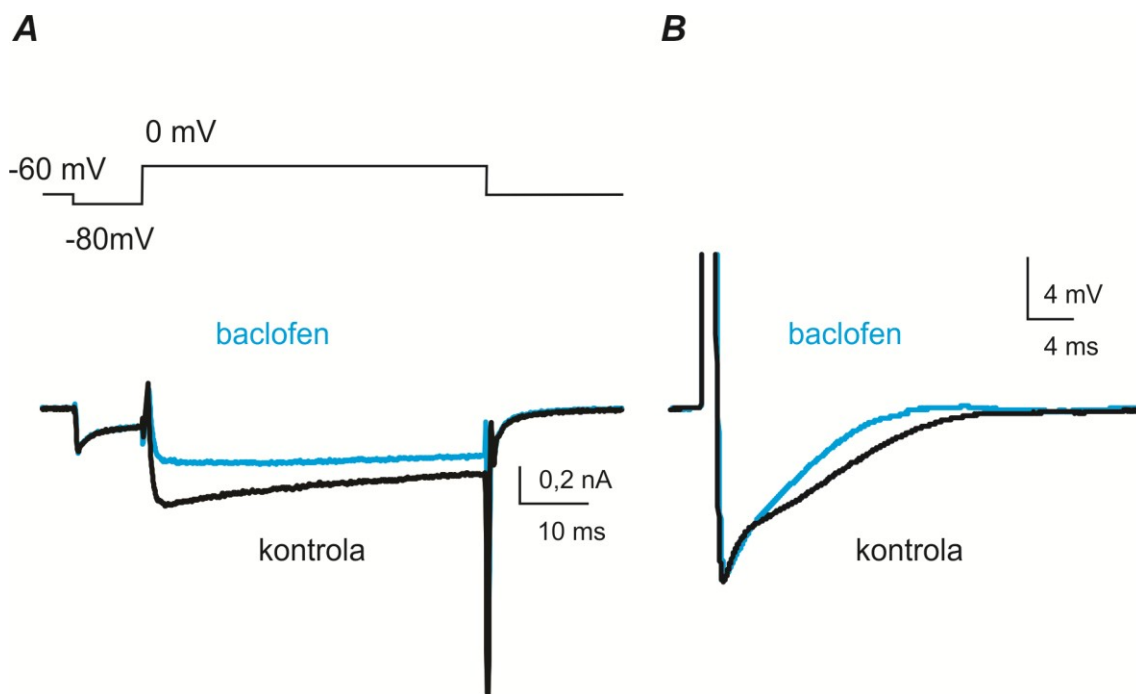
Receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) ovlivňují chování neuronálních buněk modulací aktivity různých enzymů či rozličných typů iontových kanálů. GABA<sub>B</sub> receptor, GPCR pro inhibiční neuropřenašeč GABA, reguluje buněčné funkce inhibicí adenylátcyklázy a napětově závislých Ca<sup>2+</sup> kanálů (VGCC) nebo aktivací K<sup>+</sup> kanálů typu GIRK. Na Heldově synapsi modulují presynaptické GABA<sub>B</sub> receptory sekreci glutamátu inhibicí Ca<sup>2+</sup> kanálů typu P/Q, N a R (Isaacson, 1998; Takahashi et al., 1998; Wu et al., 1999; Kajikawa et al., 2001) a snížením presynaptické koncentrace cAMP (Sakaba and Neher, 2003). Efektory a funkce postsynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů na této synapsi však doposud nebyly objasněny. Cílem této části práce bylo zkoumat úlohu a mechanismus působení GABA<sub>B</sub> receptorů na hlavních neuronech v MNTB myši.

##### **4.4.1. GABA<sub>B</sub> receptory na hlavních neuronech MNTB regulují posthyperpolarizační fázi postsynaptických AP**

Pro sledování aktivity postsynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů jsme zvolili elektrofyziologickou techniku terčíkového zámku. Snímali jsme baclofenem aktivované GABA<sub>B</sub> odpovědi z celých hlavních neuronů v řezech MNTB izolovaných z 18-28 denních myši. Uvažovali jsme dva typy GABA<sub>B</sub> odpovědí, K<sup>+</sup> proudy vyvolané aktivací GIRK a inhibicí postsynaptických Ca<sup>2+</sup> proudů vyvolaných napětovými stimuly. Vzhledem k tomu, že exprese podjednotek GIRK je v MNTB na velmi nízké úrovni (Karschin et al., 1996) a elektrofyziologické práce neprokázaly baclofenem aktivované GIRK proudy u neuronů MNTB (Takahashi et al., 1998), zvolili jsme pro detekci GABA<sub>B</sub> aktivity její účinky na postsynaptické Ca<sup>2+</sup> proudy. Dřívější práce ukázaly, že hlavní neurony MNTB generují napětím aktivované Ca<sup>2+</sup> proudy s relativně vysokými amplitudami (Bollmann et al., 1998; Barnes-Davies et al., 2001). Jednalo se o odpovědi tzv. high-voltage activated (HVA) VGCC, které jsou typicky aktivovány během postsynaptického AP a stimulují Ca<sup>2+</sup> aktivované K<sup>+</sup> kanály (K<sub>Ca</sub>) a posthyperpolarizační fázi AP (AHP) (Sah and Faber, 2002; Adelman et al., 2012). Tento Ca<sup>2+</sup> závislý mechanismus regulace postsynaptické excitability doposud v MNTB popsán nebyl.

Pokud by se nám jej podařilo identifikovat, umožnil by studovat úlohu postsynaptických  $GABA_B$  receptorů v modulaci  $Ca^{2+}$  vodivosti vyvolaných fyziologickými stimuly.

Nejprve jsme provedli pokusy, při nichž jsme stimulovali odpovědi postsynaptických VGCC napěťovými skoky z -80 na 0 mV a zjišťovali jejich citlivost k baclofenu (Obr. 29 A). Ukázalo se, že 100  $\mu$ M baclofen inhiboval amplitudu  $Ca^{2+}$  proudů na  $58,1 \pm 20,4\%$  ( $n = 7$ ,  $p < 0,001$ ).



**Obr. 29. Postsynaptické  $GABA_B$  receptory inhibují odpovědi VGCC a mAHP u hlavních neuronů MNTB**

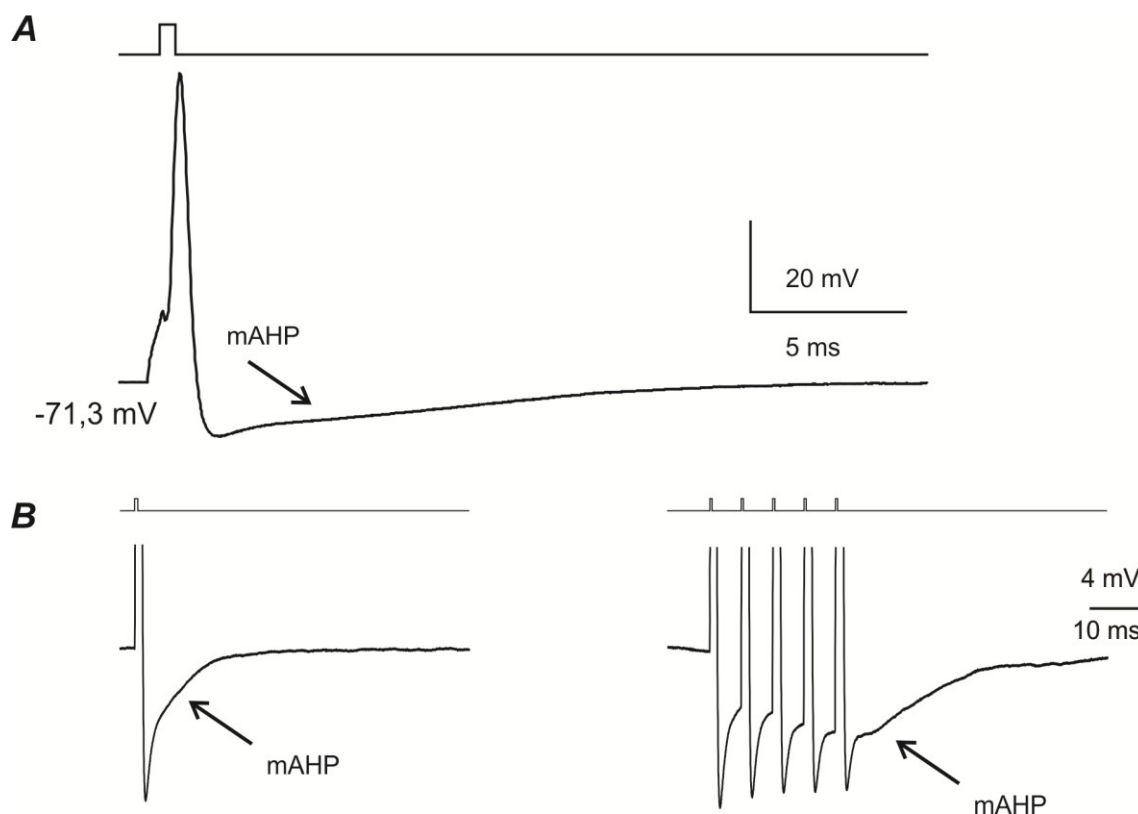
*A, Proudý postsynaptických VGCC aktivovaných napěťovými skoky byly inhibovány v přítomnosti baclofenu. B, Baclofen inhiboval mAHP postsynaptických AP snímaných z hlavního neuronu MNTB.*

Ve druhé části pokusů jsme testovali efekty baclofenu na AHP postsynaptických AP (Obr. 29 B). AHP byla v MNTB studována technikou proudového zámku. Krátké proudové depolarizační pulsy (0,4-0,9 nA/ 0,5 ms) aplikované přes snímací elektrodu vyvolaly u hlavních neuronů AP následované AHP (Obr. 30 A, B), která dosahovala své maximální amplitudy  $-2,1 \pm 2,6$  mV v čase ( $11,3 \pm 1,8$  ms,  $n = 9$ ) po hrotu AP (Obr. 27 C), což naznačovalo, že se jedná o tzv. střední fázi posthyperpolarizace (mAHP). Baclofen snižoval amplitudu mAHP z  $-4,6 \pm 2,3$  mV na  $-3,6 \pm 2,1$  mV ( $n = 17$ ,  $p < 0,001$ ). Pomalá fáze AHP nebyla u hlavních neuronů MNTB vůbec pozorována a repolarizační fáze AP tj. rychlá fáze AHP baclofenem

ovlivněna nebyla. Nezaznamenali jsme totiž výrazné změny šíře AP měřené v polovině jeho maximální amplitudy (tzv. half width AP byla  $532,7 \pm 81,0 \mu\text{s}$  v kontrole versus  $540,1 \pm 76,3 \mu\text{s}$  v přítomnosti baclofenu,  $n = 17$ ,  $p = 0,604$ ). Tyto výsledky dokládají funkční spřažení postsynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů a VGCC a naznačují, že GABA<sub>B</sub> receptory regulují Ca<sup>2+</sup> stimulované vodivosti u hlavních neuronů MNTB.

#### 4.4.2. Mechanismus mAHP u hlavních neuronů MNTB

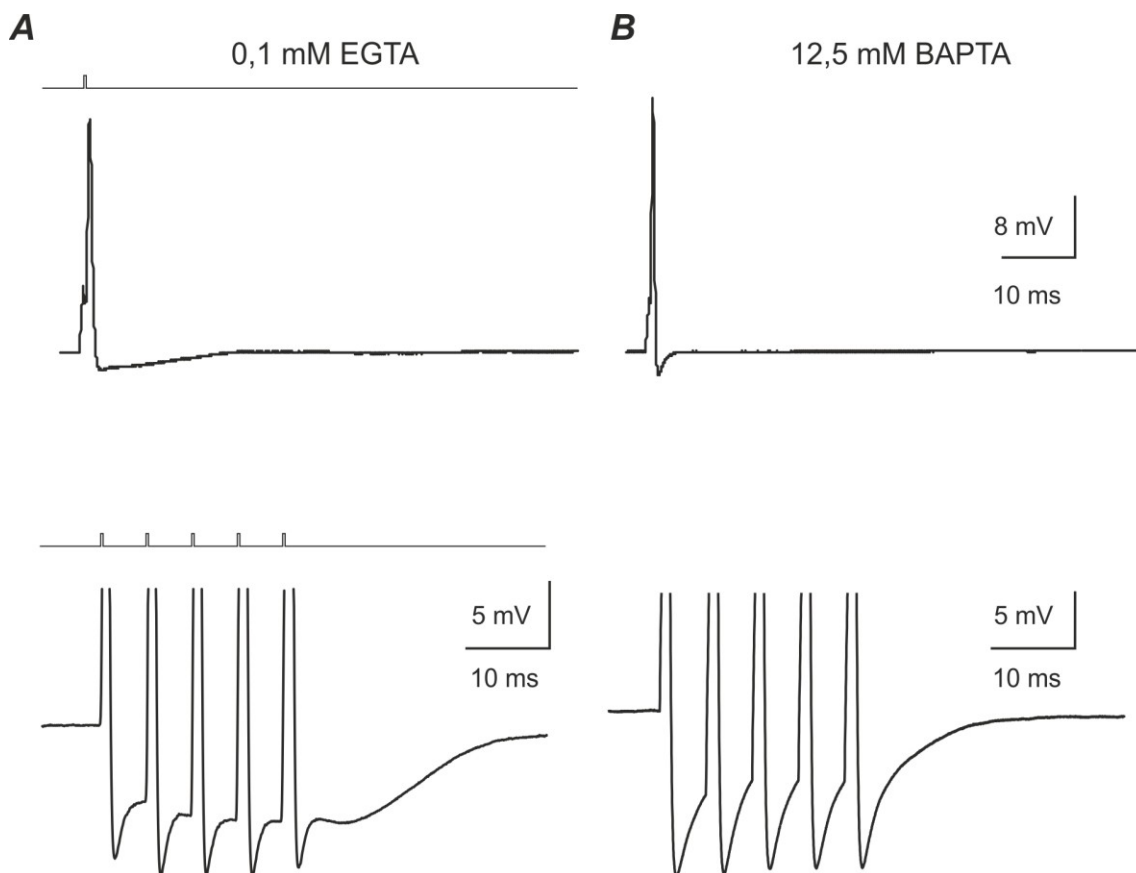
Naše pokusy ukázaly dříve neidentifikovanou mAHP u AP generovaného hlavními neurony MNTB. Dále jsme chtěli zjistit, jak je mAHP spouštěna a jaké iontové kanály se na jejím vzniku podílejí. Nejprve jsme zkoumali Ca<sup>2+</sup> závislost mAHP. Obr. 30 B ukazuje, že amplituda mAHP byla zvýšena po sérii AP vyvolaných s vysokou frekvencí (3-5@100-200 Hz).



**Obr. 30. Identifikace mAHP v záznamech AP z hlavních neuronů MNTB**

*A*, Příklad AP vyvolaného proudovým stimulem (0,5 nA/ 0,5 ms) přivedeným na membránu hlavního neuronu MNTB. Šipka ukazuje mAHP. *B*, Amplituda mAHP je zvýšena po sérii 5 AP stimulovaných ve frekvenci 200 Hz (vpravo).

To naznačilo, že mAHP je spouštěna zvýšením intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . V souladu s tímto předpokladem, přidání  $\text{Ca}^{2+}$  chelátoru s rychlou kinetikou, 12,5 mM BAPTA (Tsien, 1980) do intracelulárního roztoku inhibovalo mAHP, ačkoli byla mAHP pozorována při použití intracelulárního roztoku obsahujícího nízkou koncentraci (0,1mM) EGTA (Obr. 31 A, B).

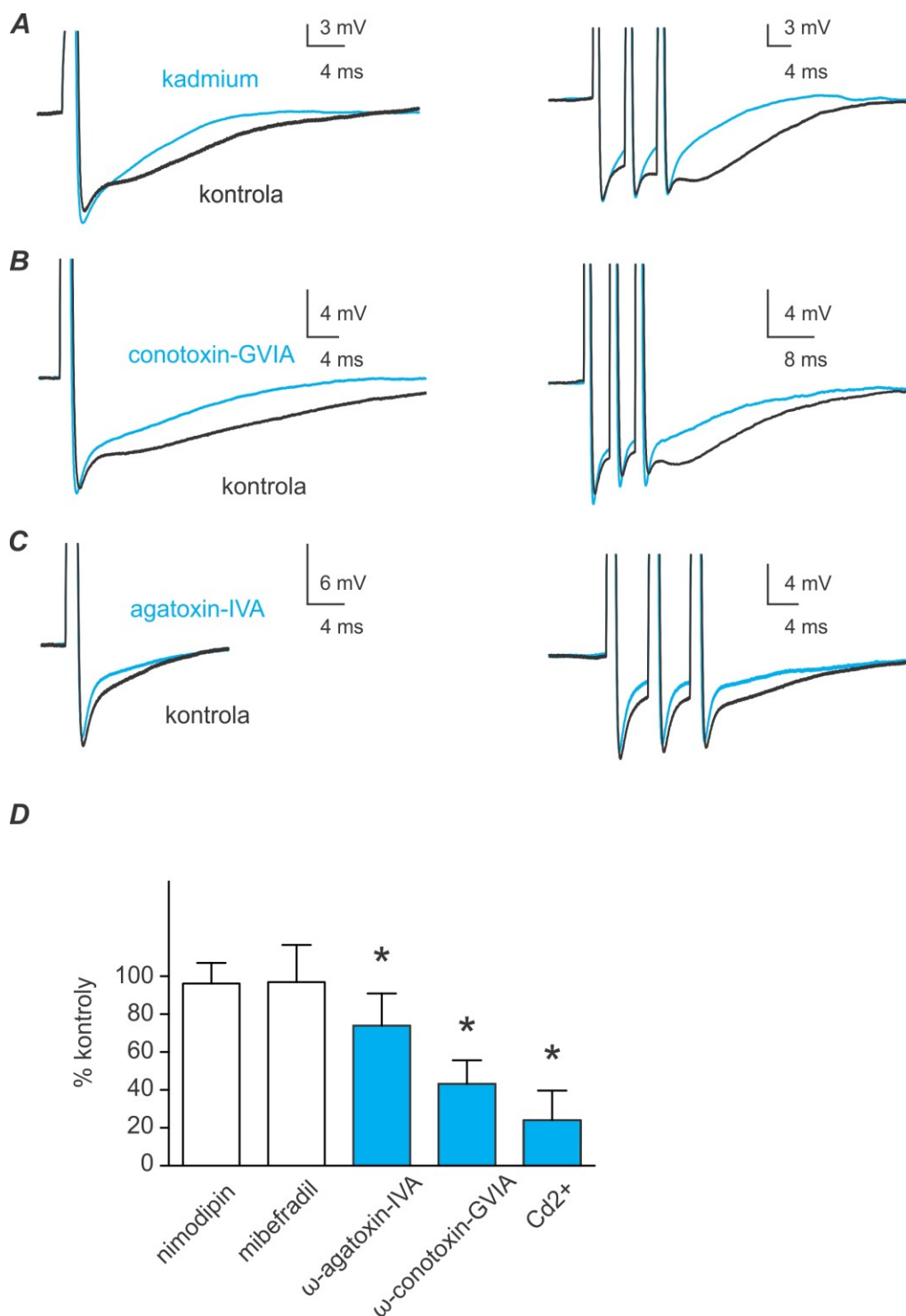


**Obr. 31. Vznik mAHP je závislý na zvýšení nitrobuněčné koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$**

**A, B,** Příklady AP snímány z hlavních neuronů dialyzovaných intracelulárním roztokem obsahujícím nízkou (0,1 mM EGTA) nebo vysokou (12,5 mM BAPTA) koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  chelátoru (nahore). Detaily zobrazující mAHP u sérií pěti AP nasnímaných s frekvencí 200 Hz ze stejných neuronů (dole).

Sprážením mAHP s depolarizační fází AP ukazovalo na to, že zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  bylo vyvoláno vtokem vápenatých iontů přes HVA VGCC. To bylo podpořeno pozorováním inhibice mAHP v přítomnosti  $\text{Cd}^{2+}$ , nespecifického blokátoru HVA VGCC (Gadbut et al., 1991). Přidání 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  do extracelulárního roztoku vedlo ke snížení amplitudy mAHP ze  $7,7 \pm 2,5$  mV na  $-2,0 \pm 1,6$  mV ( $n = 5$ ,  $p = 0,003$ ) (Obr. 32 A, D). Existuje

několik podtypů HVA VGCC (Zamponi et al., 2015). Neurony MNTB exprimují zejména kanály typu P/Q a N (Barnes-Davies et al., 2001).



**Obr. 32.** Vznik mAHP v MNTB je umožněn vtokem  $\text{Ca}^{2+}$  přes VGCC typu N a P/Q

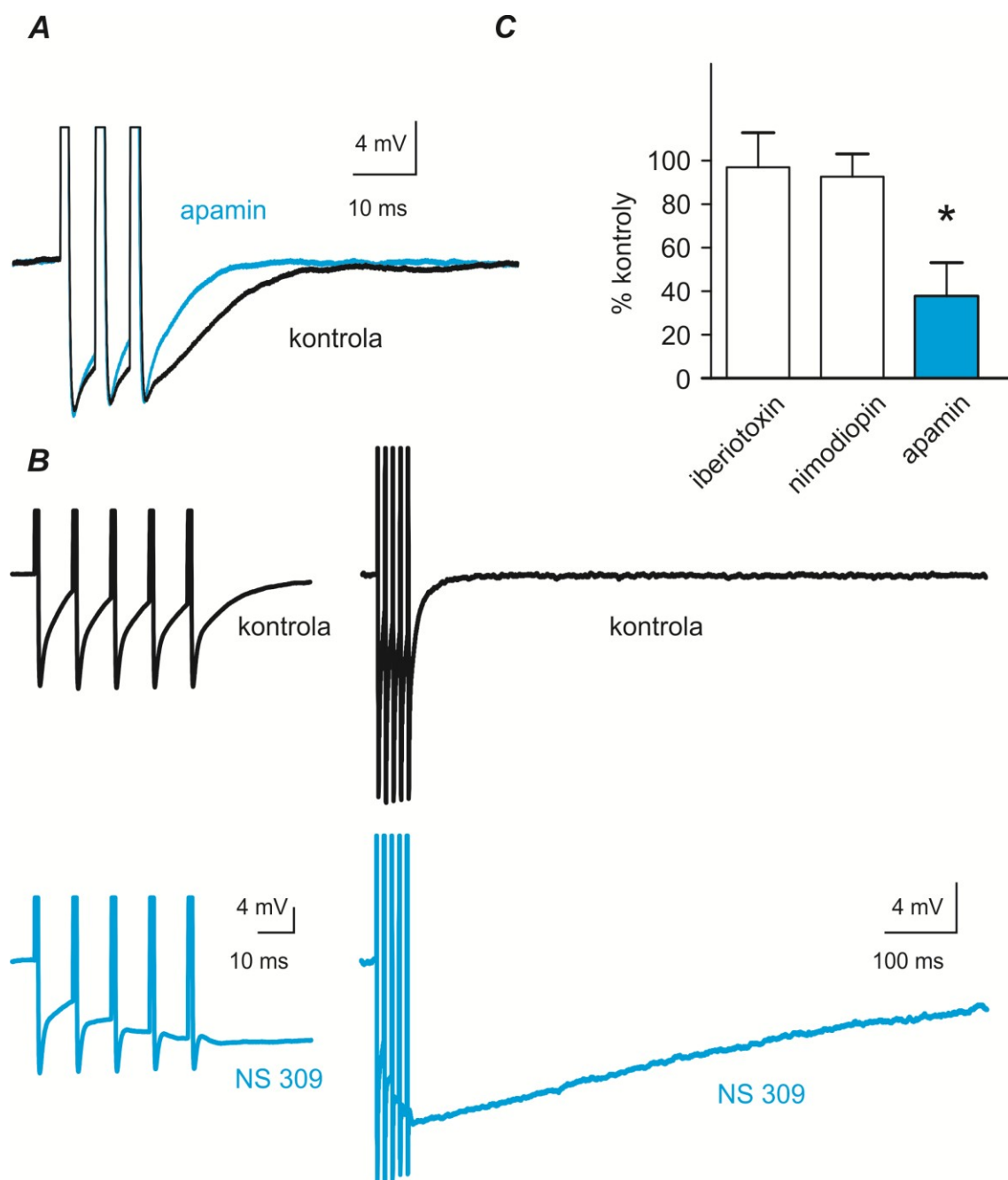


*A, Reprezentativní záznamy mAHP následující jednotlivé AP nebo série tří AP (200 Hz) stimulované v nepřítomnosti (černě) a přítomnosti (modře)  $\text{Cd}^{2+}$ , nescifického inhibitoru VGCC. B, C, Jednotlivé AP a jejich série nasnímané v nepřítomnosti a přítomnosti  $\omega$ -conotoxinu-GVIA (inhibitor N-typu VGCC) a  $\omega$ -agatoxinu-IVA (inhibitor P/Q typu VGCC). D, Souhrnný graf efektů všech použitých inhibitorů VGCC. Data byla získána ze 34 neuronů. (\* $p < 0.05$ , párový  $t$  test).*

Abychom zjistili podtyp podílející se na mechanismu vzniku mAHP, zkoumali jsme citlivost amplitudy mAHP k podjednotkově selektivním inhibitorům VGCC. Nimodipin a mibefradil (10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ ), které specificky blokují VGCC typu L a T (McCarthy and TanPiengco, 1992; Mehrke et al., 1994) neměly na mAHP významný vliv (Obr. 32 D). Naopak 10  $\mu\text{M}$   $\omega$ -conotoxin-GVIA a 200 nM  $\omega$ -agatoxin-IVA, což jsou blokátory VGCC typu N a P/Q (Sato et al., 1993; Wright and Angus, 1997) významně inhibovaly amplitudy mAHP ( $\omega$ -conotoxin-GVIA: ze  $-6,6 \pm 2,1$  mV na  $-3,0 \pm 1,6$  mV,  $n = 7$ ,  $p < 0,001$ ;  $\omega$ -agatoxin-IVA: z  $-4,6 \pm 2,3$  mV na  $-3,6 \pm 2,5$  mV,  $n = 5$ ,  $p = 0,04$ ) (Obr. 32 B, C, D). Naše pokusy tak ukázaly, že mAHP je u hlavních neuronů MNTB spouštěna vtokem  $\text{Ca}^{2+}$  přes VGCC typu N a P/Q.

#### **4.4.3. Membránová vodivost zprostředkující mAHP u hlavních neuronů MNTB**

Další série pokusů byla zaměřena na identifikaci iontových kanálů aktivovaných během mAHP. Vhodnými kandidáty účinně propojujícími přechodné změny v intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  se změnami membránového potenciálu jsou  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , které jsou hojně exprimovány v nervové tkáni a v receptorových buňkách senzorických systémů (Sailer et al., 2004; Noble et al., 2010; Seidel et al., 2011; Shenton et al., 2014; Rohmann et al., 2015).  $\text{K}_{\text{Ca}}$  se účastní repolarizace AP, vzniku různých složek AHP a s nimi souvisejícím vlivem na neuronální excitabilitu (Bond et al., 1999; Adelman et al., 2012). Existují tři typy vápníkem aktivovaných draslíkových kanálů: BK, vyznačující se vysokou vodivostí a citlivostí k iberiotoxinu (Galvez et al., 1990), IK se středně vysokou vodivostí a citlivostí k nimodipinu (Jiang et al., 2007) a SK, s nízkou vodivostí ( $\sim 10$  pS). SK kanály jsou vysoce citlivé k apaminu, toxinu včelího jedu, který je jejich selektivním inhibitorem (Blatz and Magleby, 1986; Grunnet et al., 2001; Pedarzani et al., 2005; Hongyuan et al., 2016).

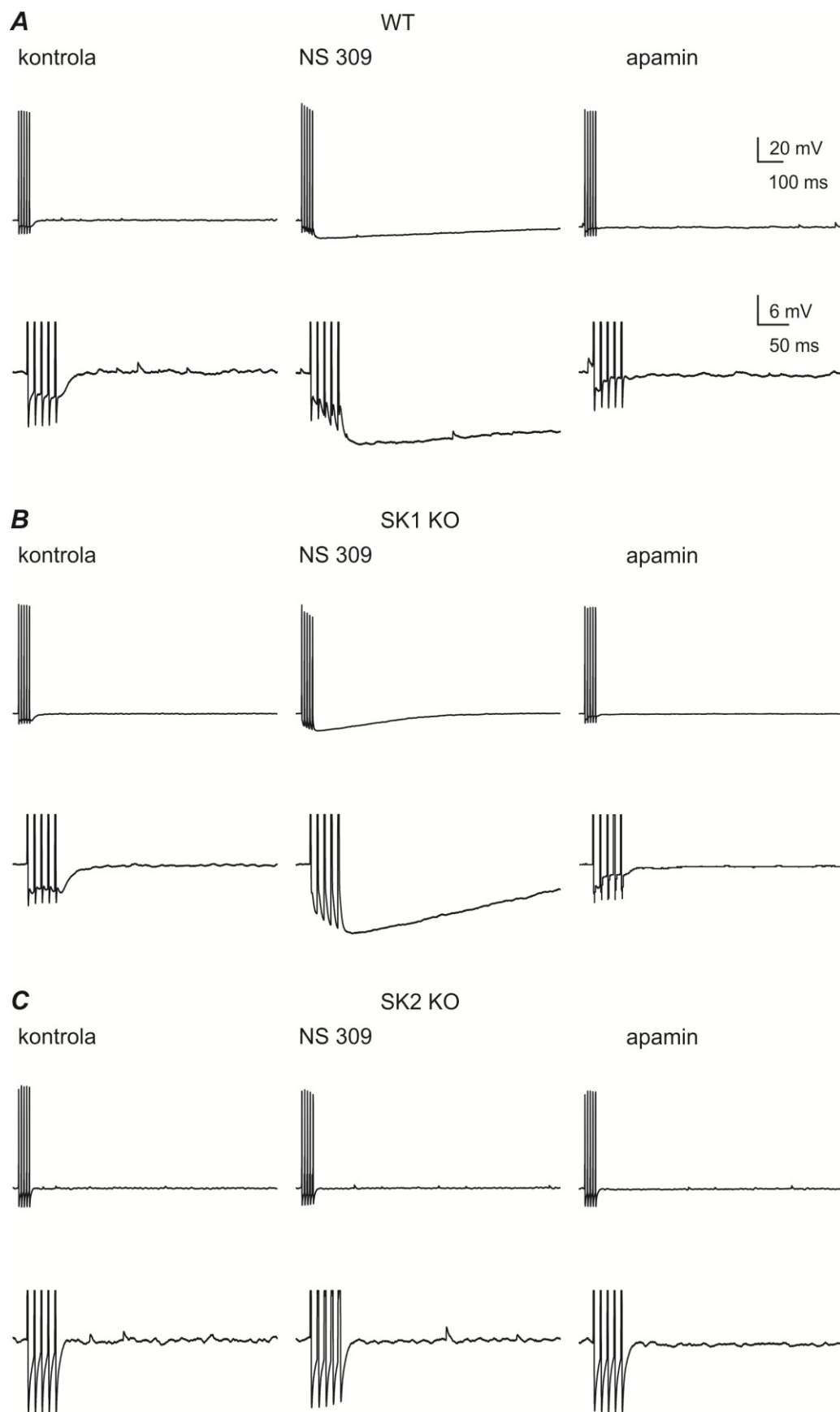


**Obr. 33. mAHP je zprostředkována aktivitou SK kanálů**

*A*, mAHP u série AP (3@200 Hz) nasnímaná v nepřítomnosti nebo v přítomnosti apaminu, specifického inhibitoru SK kanálů. *B*, mAHP u sérií AP (5@100 Hz) nasnímaných za kontrolních podmínek (nahore) a v přítomnosti NS309, pozitivního alosterického modulatoru SK kanálů. *C*, Sloupcový graf shrnuje vlivy specifických inhibitorů jednotlivých typů  $K_{Ca}$  na amplitudu mAHP. Hodnoty byly získány ze 16 neuronů. (\* $p < 0.05$ , párový  $t$  test).

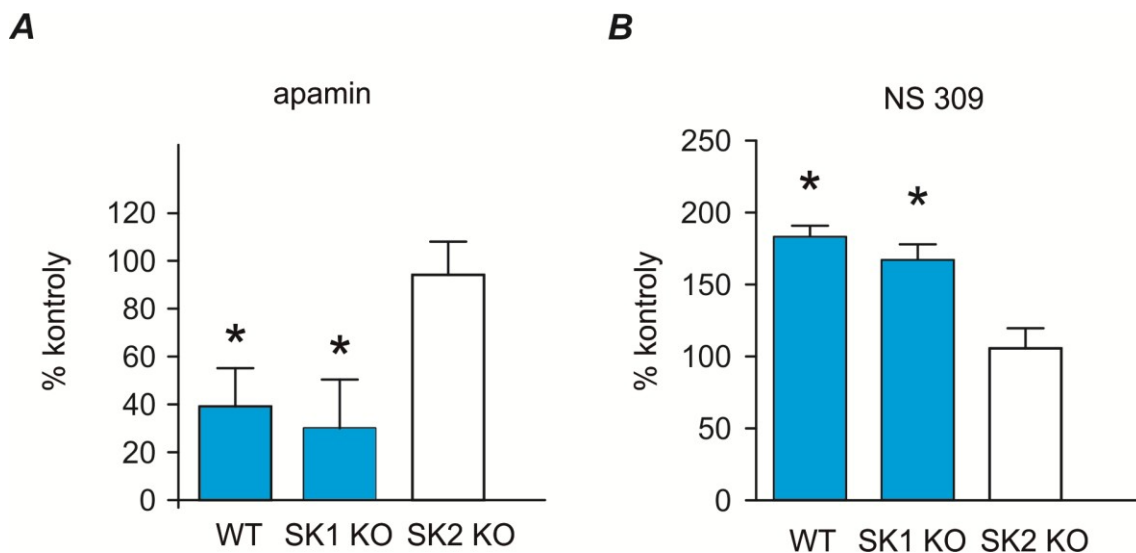
V našich pokusech jsme postupně testovali všechny uvedené inhibitory  $K_{Ca}$  na jejich vliv na mAHP. Iberiotoxin (60 nM) a nimodipin (10  $\mu$ M) významně neměnily časový průběh postsynaptických AP včetně mAHP, což naznačuje, že hustota BK a IK kanálů na hlavních neuronech MNTB je nízká (Obr. 33 C). Naopak 300 nM apamin výrazně snižoval amplitudu mAHP (z  $-5,5 \pm 1,5$  mV v kontrole na  $-2,1 \pm 0,9$  mV v apaminu,  $n = 7$ ,  $p < 0,001$ ) (obr 33 A, C), což naznačovalo, že mAHP byla zprostředkována aktivitou SK kanálů. Apamin neměnil klidový membránový potenciál hlavních neuronů, ani neměnil časový průběh depolarizační fáze AP. To svědčilo proti možnému nepřímému vlivu apaminu na mAHP, např. modulací bazální excitability neuronů. Amplituda mAHP byla navíc zvýšena NS309, pozitivním alosterickým modulátorem SK kanálů (Strøbaek et al., 2004; Pedarzani et al., 2005). Obr. 33 B ukazuje příklad potenciace mAHP vysokofrekvenční sérií AP vyvolaných v přítomnosti 10  $\mu$ M NS309 (z  $-2,1 \pm 1,3$  mV v kontrole na  $-11,7 \pm 3,4$  mV v NS309,  $n = 4$ ,  $p = 0,006$ ). Výsledky našich pokusů tak ukázaly, že mAHP u hlavních neuronů MNTB je způsobena  $K^+$  vodivostí vyvolanou aktivitou SK kanálů.

Cílem dalších pokusů bylo identifikovat podtyp SK kanálů zprostředkující mAHP u hlavních neuronů MNTB. Buňky centrálního nervového systému obecně exprimují tři typy podjednotek SK kanálů (SK1, SK2 a SK3) (Sailer et al., 2004). Různé kombinace těchto podjednotek tvoří funkční homo- nebo heterooligomerní komplexy v plazmatické membráně buněk (Stocker and Pedarzani, 2000; Sailer et al., 2004; Stocker, 2004). V SOC byla nalezena mRNA pro podjednotky SK1 a SK2, ale imunohistochemicky byla prokázána exprese pouze podjednotky SK2. Z důvodu nedostupnosti spolehlivých podjednotkově selektivních modulátorů SK kanálů jsme používali myši s vyřazenou expresí genů pro SK1 a SK2. Stimulovali jsme postsynaptické AP ve frekvenci 100 Hz a analyzovali jsme amplitudy akumulovaných mAHP po sérii pěti AP v přítomnosti a nepřítomnosti apaminu nebo NS309. Inhibice mAHP apaminem nebo její potenciace NS309 sloužily jako důkazy povrchové exprese funkčních podjednotek SK hlavními neurony. Zjistili jsme, že delece SK1 neměnila významně citlivost mAHP jak k apaminu (snížení amplitudy mAHP z  $-5,5 \pm 1,5$  mV na  $-2,1 \pm 0,9$  mV  $n = 4$ ,  $p = 0,003$ ), tak k NS309 (potenciace amplitudy mAHP z  $-5,1 \pm 1,7$  mV v kontrole na  $-16,2 \pm 3,2$  mV v NS309,  $n = 8$ ,  $p < 0,001$ ) (Obr. 34 B a 35).



**Obr. 34. Vlastnosti mAHP u neuronů s chybějícími podjednotkami SK kanálů**

**A**, Záznamy nahoře ukazují série pěti AP stimulovaných ve frekvenci 100 Hz u hlavního neuronu v řezu MNTB izolovaného z myši divokého typu (WT), představující genetický základ pro SK1 KO a SK2 KO myši. AP byly snímány v absenci (kontrola) a v přítomnosti NS309 nebo apaminu. Amplituda akumulované mAHP byla zvýšena vlivem NS309 a inhibována po aplikaci apaminu (dole). **B**, Série AP (5@100 Hz) snímaná z neuronu s chybějícími SK1 v absenci (kontrola) a v přítomnosti NS309 nebo apaminu. Delece SK1 neměnila modulační vliv NS309 a apaminu. **C**, Série AP (5@100 Hz) snímaná z neuronu s chybějícími SK2 v absenci (kontrola) a v přítomnosti NS309 nebo apaminu. Delece SK2 vedla k dramatickému snížení mAHP a eliminovala modulační vliv NS309 a apaminu.



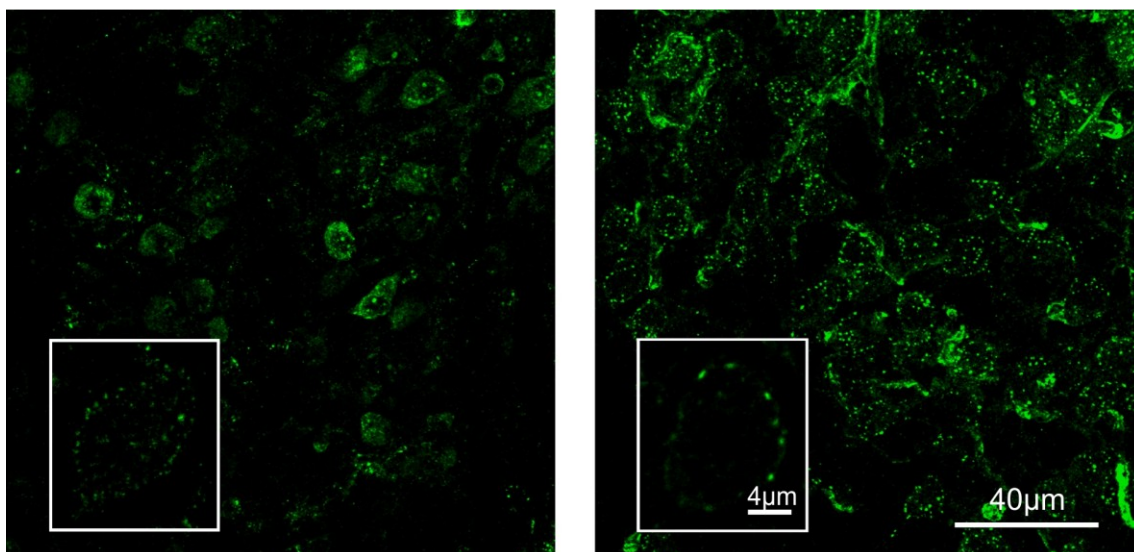
**Obr. 35. Iontové kanály zprostředkující mAHP jsou tvořeny podjednotkami SK2**

**A**, Souhrnný graf efektů apaminu na mAHP u divokého typu myši a myši s vyřazenou expresí SK1 či SK2 podjednotky SK kanálů. **B**, Souhrnný graf efektů NS309 na mAHP u divokého typu myši a myši s vyřazenou expresí SK1 či SK2 podjednotky. Hodnoty byly získány ze 17 buněk pro apamin a ze 16 buněk pro NS309. (\* $p < 0.05$ , párový  $t$  test)

Naopak delece podjednotky SK2 výrazně ovlivnila mAHP. Série AP snímaná z neuronů v řezech izolovaných z SK2 KO myši nevykazovala prakticky žádnou mAHP a membránový potenciál měřený v čase odpovídajícím vrcholu mAHP u SK2 KO myši nebyl citlivý k apaminu (změna membránového potenciálu z  $-2,5 \pm 0,7$  mV, na  $-2,4 \pm 0,9$  mV,  $n = 6$ ,  $p = 0,495$ ) ani k NS309 (změna membránového potenciálu z  $-2,5 \pm 0,7$  mV, na  $-2,5 \pm 0,6$  mV,  $n = 4$ ,  $p = 0,915$ )

(Obr. 34 C). Naše výsledky tak ukazují, že SK kanály zprostředkující mAHP u hlavních neuronů obsahovaly podjednotku SK2.

Na závěr této části jsme provedli imunohistochemické pokusy, zaměřené na lokalizaci SK kanálů v řezech MNTB. Řezy jsme značili primárními protilátkami specificky rozeznávajícími podjednotky SK1, SK2 nebo SK3. Značení jsme analyzovali pomocí konfokální mikroskopie a zjistili jsme, že většina hlavních neuronů MNTB byla imunopozitivní na SK2 (Obr. 36). Slabší, ale stále specifické fluorescenční signály poskytovaly i protilátky namířené proti SK1. Značení protilátkou proti SK2 podjednotce ukazovalo membránově vázané shluky. Protilátka proti SK1 vykazovala zejména intracelulární značení a membránové shluky bylo možno pozorovat pouze výjimečně (Obr. 36). Protilátky rozeznávající SK3 podjednotku neposkytovaly v MNTB specifické signály (neukázáno).



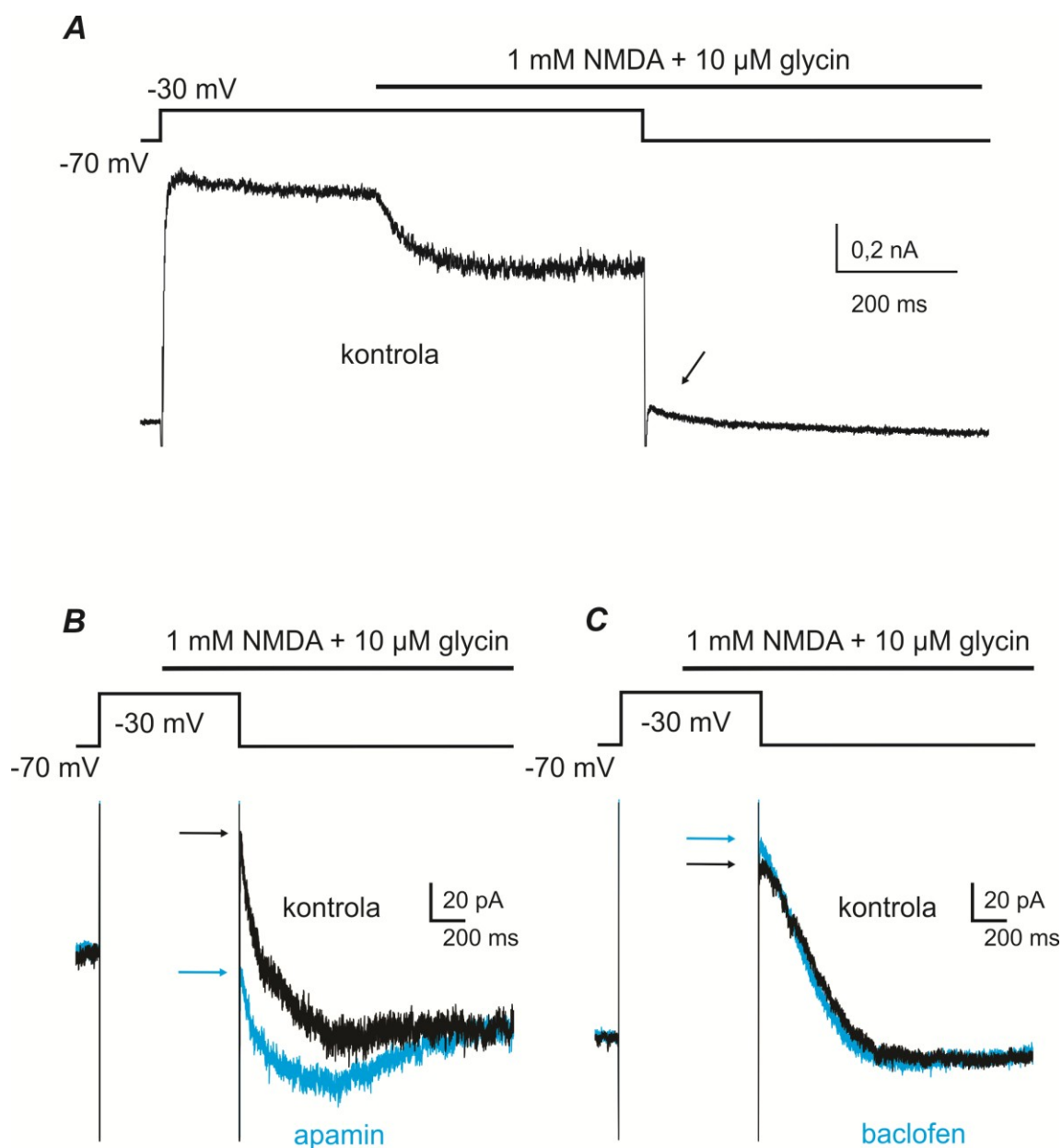
**Obr. 36. Značení hlavních neuronů MNTB pomocí protilátek rozeznávajících podjednotky SK kanálů**

*Fluorescenční obrázky řezů MNTB značených protilátkami namířenými proti jednotlivým podtypům SK1 (vlevo) a SK2 (vpravo) podtypu SK kanálů. Povrchové značení vykazovala zejména protilátka proti podjednotce SK2. Zvětšeniny představují jednu rovinu snímání konfokálním mikroskopem a ukazují membránově umístěné shluky protilátek SK1 a SK2.*

Výsledky imunohistochemických pokusů jsou tak v souladu s elektrofyzilogickými nálezy a potvrzují významnou expresi SK2 podjednotek hlavními neurony MNTB. Pokusy však také ukázaly přítomnost SK1 podjednotek v hlavních neuronech, což naznačuje, že SK kanály zprostředkující mAHP by mohly být tvořeny buď jako homooligomery SK2 nebo jako heteromery SK1/SK2 (viz. Diskuse).

#### 4.4.4. Mechanismus modulace SK kanálů GABA<sub>B</sub> receptory

Naše výsledky ukázaly, že postsynaptické GABA<sub>B</sub> receptory inhibují mAHP, která je spouštěna Ca<sup>2+</sup> proudy tekoucími přes VGCC typu N a P/Q a je zprostředkována aktivitou Ca<sup>2+</sup> závislých SK kanálů. Baclofenem aktivované GABA<sub>B</sub> receptory inhibovaly rovněž proudové odpovědi VGCC u hlavních neuronů a je pravděpodobné, že toto působení tvořilo i základ mechanismu inhibice mAHP. Alternativní vysvětlení efektu baclofenu by však spočívalo v tom, že GABA<sub>B</sub> receptory inhibují buď přímo SK kanály, nebo Ca<sup>2+</sup> závislé procesy vedoucí k jejich aktivaci. Provedli jsme proto doplňující pokusy s cílem potvrdit nebo vyvrátit některou z uvedených hypotéz. V těchto pokusech jsme stimulovali aktivitu SK kanálů způsobem nezávislým na VGCC, aktivací Ca<sup>2+</sup> propustných glutamátových receptorů typu NMDA (N-methyl-D aspartát). Snímali jsme NMDA vyvolané proudy SK kanálů a sledovali jejich citlivost k baclofenu. Používali jsme následující protokol (viz Obr. 37 A): v přítomnosti Cd<sup>2+</sup> jsme na membránu hlavních neuronů přiváděli depolarizační skoky (z -70 mV na -30 mV), sloužící k přechodnému uvolnění blokády NMDA receptorů ionty Mg<sup>2+</sup> a aktivovali jsme tyto receptory aplikací NMDA a glycinu (koagonista NMDA receptoru). Předpokládali jsme, že to vedlo ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> u hlavních neuronů. Následně jsme vyvolali návrat membránového potenciálu na -70 mV, což způsobilo opětovné zablokování NMDA receptorů ionty Mg<sup>2+</sup> a umožnilo projev proudů zprostředkovaných SK kanály. Ty byly identifikovány na základě jejich citlivosti k apamínu (Obr. 37 B). Pro lepší rozlišitelnost byly odpovědi SK kanálů stimulovány aplikací pozitivního alosterického modulátoru 1-EBIO (1 mM) a odpovědi GlyR byly blokovány strychninem (0,3 μM). Amplituda NMDA aktivovaných proudů SK nebyla významně změněna v přítomnosti baclofenu (z 84,7 ± 47,3 pA na 80,9 ± 33,6 pA,  $n = 5$ ,  $p = 0,59$ ) (Obr. 37 C). Toto pozorování je v rozporu s přímým vlivem GABA<sub>B</sub> receptorů na SK kanály nebo na jejich Ca<sup>2+</sup> závislý mechanismus aktivace. Naše výsledky tak upřednostňují nepřímé interakce mezi GABA<sub>B</sub> receptory a SK kanály a ukazují, že inhibice VGCC je nezbytným krokem v mechanismu GABA<sub>B</sub> receptory vyvolané modulace mAHP.



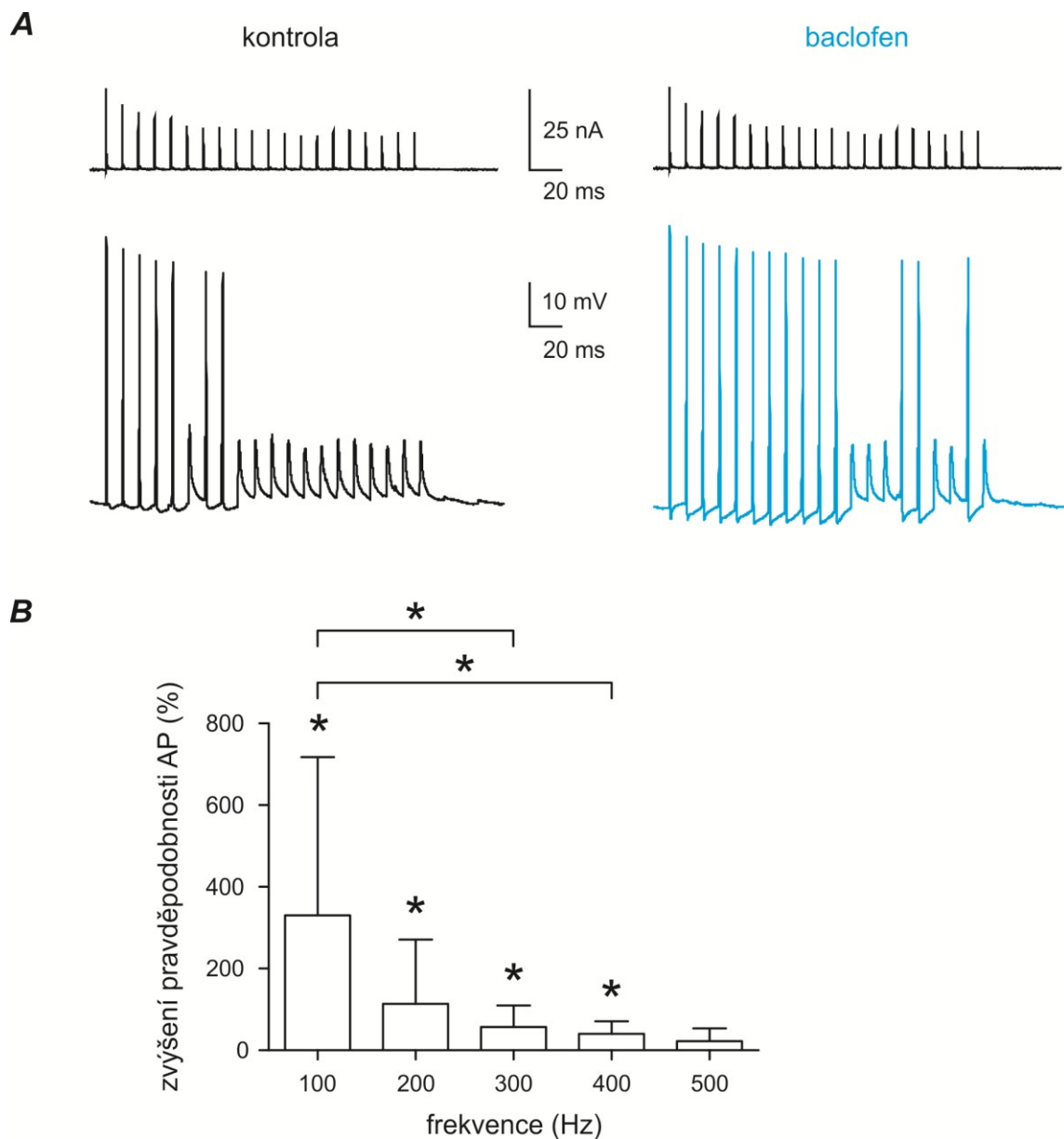
**Obr. 37. NMDA vyvolané odpovědi SK kanálů jsou necitlivé k baclofenu**

*A*, Odpověď hlavního neuronu na depolarizační stimul, během něhož byl aplikován 1 mM NMDA a 10  $\mu$ M glycine. Relaxační proudy po repolarizaci membránového potenciálu (šipka) byly vyvolány aktivitou SK kanálů. Odpovědi byly snímány v přítomnosti 100  $\mu$ M  $\text{Cd}^{2+}$ , 1 mM 1-EBIO a 0,3  $\mu$ M strychninu. *B*, Amplituda relaxačního proudu byla inhibována v přítomnosti apaminu na  $49,6 \pm 9,4\%$  ( $n = 3$ ,  $p = 0,034$ ). *C*, NMDA indukovaný proud SK kanálů nebyl blokován v přítomnosti baclofenu.



#### 4.4.5. Úloha modulace SK kanálů postsynaptickými GABA<sub>B</sub> receptory v excitačním synaptickém přenosu na Heldově synapsi.

Regulace mAHP postsynaptickými GABA<sub>B</sub> receptory naznačuje, že inhibiční přenašeč GABA může zkracovat refrakterní fázi postsynaptických AP a tím měnit pravděpodobnost s jakou hlavní neurony MNTB generují opakující se AP. Závěrečná část pokusů byla proto zaměřena na testování vlivu aktivace postsynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů na četnost výskytu AP během sérií vysokofrekvenčních stimulací. Postsynaptické AP byly vyvolávány pomocí proudových stimulů, jejichž časový průběh byl odvozen z tvaru excitačních postsynaptických proudů (Obr. 38 A), a byly snímány technikou vodivostního zámku, umožňující studovat AP vznikající přirozenějším způsobem. Tento přístup zahrnoval úpravu velikosti proudového stimulu v reálném čase podle aktuálního membránového potenciálu za použití modifikovaného Ohmova zákona (viz. Metody). Série proudových stimulů (20@100–500 Hz) byly přiváděny na membránu hlavních neuronů při fyziologické teplotě (37°C) a vyvolané napěťové odpovědi byly snímány v absenci a v přítomnosti 100 μM baclofenu (opakováno 5 x ve 40 s intervalech) (Obr. 38 A). Počítali jsme AP v našich záznamech z 13 neuronů a zjistili jsme, že baclofen průměrně zvyšoval jejich výskyt z  $9,9 \pm 2,2$  na  $14,2 \pm 2,1$  u každé série dvaceti stimulů ve frekvenci 100 Hz, z  $11,2 \pm 3,4$  na  $13,2 \pm 3,8$  (při 200 Hz), z  $11,9 \pm 2,6$  na  $14,4 \pm 3,4$  (při 300 Hz), z  $11,8 \pm 1,2$  na  $14,5 \pm 2,8$  (při 400 Hz) a z  $10,8 \pm 2,4$  na  $12,7 \pm 2,7$  (při 500 Hz). Pravděpodobnost výskytu AP klesala v průběhu každé série (Obr. 38 A). To bylo způsobeno postupným snižováním amplitudy proudových stimulů odrážejícím presynaptickou depresi glutamátergního přenosu (Fioravante and Regehr, 2011). Zjišťovali jsme proto rovnovážnou pravděpodobnost AP počítáním jejich výskytu u posledních deseti stimulací v každé sérii. Ukázalo se, že baclofen významně zvyšoval četnost AP ve frekvenčním rozmezí 100-400 Hz (Obr. 38 B). Efekt GABA<sub>B</sub> receptorů byl nejvýraznější při frekvenci 100 Hz a se zvyšující se frekvencí stimulů se postupně snižoval. Tyto výsledky tak potvrzují náš předpoklad, že postsynaptické GABA<sub>B</sub> receptory zvyšují spolehlivost vysokofrekvenčního přenosu na Heldově synapsi inhibicí mAHP postsynaptických AP.



**Obr. 38. Postsynaptické  $GABA_B$  receptory zvyšují četnost AP vyvolaných stimuly opakujícími se s vysokou frekvencí**

**A**, Napěťové odpovědi hlavních neuronů MNTB vyvolané dvaceti proudovými stimuly ve frekvenci 100 Hz (nahore) snímanými technikou vodivostního zámku (dole). Odpovědi byly snímány v absenci (kontrola) a v přítomnosti 100  $\mu$ M baclofenu. Proudové stimuly byly odvozeny z předem nasnímané série EPSC a zahrnovaly tak kinetické vlastnosti glutamátových receptorů a krátkodobou plasticitu glutamátergního přenosu. **B**, Graf ukazuje závislost zvýšení rovnovážné pravděpodobnosti AP vyvolaných posledními deseti stimuly v přítomnosti baclofenu na frekvenci proudových stimulů. Zvýšení pravděpodobnosti je

*vyjádřeno jako  $(\text{počet AP v přítomnosti baclofenu} / \text{počet AP v nepřítomnosti baclofenu}) - 1) * 100\%$ . Data byla získána z 13 buněk. Statistická významnost zvýšení pro jednotlivé frekvence byla posuzována párovým *t* testem. Statistická významnost rozdílů ve zvýšeních mezi frekvencemi byla posuzována pomocí ANOVA a Tuckeyho vícečetným srovnávacím testem.*

## 5. Diskuze

### 5.1. Podjednotková složení GlyR u MNTB neuronů

Modulace glutamatergního přenosu glycinergní inhibicí je důležitou součástí mechanismů zpracování zvukových stimulů v MNTB (Kopp-Scheinpflug et al., 2011; Borst and Soria van Hoeve, 2012). Inhibiční vlákna v MNTB vytváří synaptické boutony na povrchu hlavních neuronů a uvolňují glycin, který působí na pre- i postsynaptických GlyR. Aktivované presynaptické GlyR vyvolávají pomalu nastupující potenciaci uvolňování glutamátu, zatímco postsynaptické receptory zajišťují rychlou fázickou inhibici (Turecek and Trussell, 2001; Awatramani et al., 2004, 2005a). Rozdílná kinetika odpovědí pre- a postsynaptických GlyR naznačila, že by se mohlo jednat o dvě receptorové populace s odlišnými vlastnostmi. Tak jako u jiných typů receptorů, jsou i u GlyR jejich vlastnosti a subcelulární distribuce závislé na podjednotkovém složení. Naše pokusy byly proto zaměřeny na zkoumání podjednotkových složení pre- a postsynaptických receptorů na neuronech MNTB. V nativní nervové tkáni savců byly identifikovány různé kombinace podjednotek GlyR (Lynch, 2009). Specifické modulatory aktivity GlyR, lišících se obsahem podjednotkových izoform, jsou běžně dostupné (Lynch et al., 2017). V našich pokusech proto bylo výhodné vyvolávat otevření kanálů spojených s GlyR aplikací agonisty a pomocí elektrofyziologických metod snímat membránové proudy jak v nepřítomnosti, tak v přítomnosti modulatoru. Srovnáním odpovědí pak získat představu o složení GlyR v MNTB. Podobně byla v minulosti zkoumána podjednotková složení např. ionotropních glutamátových receptorů na hipokampálních neuronech nebo GABA<sub>A</sub> receptorů v mozečku (Alsbo et al., 2001; Thomas et al., 2006). Výhodou uvedeného přístupu oproti dnes často používané „single cell PCR“ je nalezení vlastností funkčních ionotropních receptorů a ne jen úrovně jejich celkové exprese danou buňkou. Naše pokusy ukázaly, že oproti somatodendritickým vykazovaly kaliceální odpovědi vysokou citlivost k PTX, což svědčilo o tom, že receptory přítomné na Heldových kališích jsou tvořeny jako  $\alpha$  homomery (Lynch et al., 1995; Legendre, 1997). Je zajímavé, že  $\alpha$  homomerní receptory byly nalezeny též na glycinergních zakončeních potkaního sakrálního zadního komisurálního jádra míšního (Jeong et al., 2003), supraoptického jádra (Deleuze et al., 2005), bipolárních buňkách sítnice (Mørkve and Hartveit, 2009), či mechových vláknech hipokampu (Kubota et al., 2010), ale (Lee et al., 2009). To naznačuje, že  $\alpha$  homomerní receptory by mohly představovat obecnější presynaptický fenotyp GlyR centrální nervové soustavy savců a působit tak jako protějšek postsynaptických

$\alpha 1\beta$  heteromerních receptorů, kotvených v postsynaptické denzitě interagujícím proteinem gephyrinem. Ke zobecnění tvrzení o složení presynaptických GlyR, budou potřeba následná zkoumání v dalších oddílech centrálního nervového systému (Kawa, 2003; Ye et al., 2004).

Citlivost GlyR přítomných na somatodendritických částech hlavních neuronů MNTB a na GBC ventrálního kochleárního jádra k ICS205,930 a necitlivost k PTX naznačovaly, že tyto receptory jsou heteromery obsahující  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky. To bylo potvrzeno značením těchto receptorů protilátkami proti gephyrinu, proteinu specificky interagujícímu s  $\beta$  podjednotkou. Naše pozorování doplňují podobné nálezy učiněné v minulosti v rámci ventrálního kochleárního jádra myši a morčete (Wu and Oertel, 1986; Harty and Manis, 1996). Vzhledem k tomu, že u čerstvě narozených potkanů byly glycinové odpovědi neuronů MNTB silně inhibovány PTX, můžeme na základě našich výsledků předpokládat, že zde dochází k vývojové změně GlyR z  $\alpha 2$  homomerní na  $\alpha 1\beta$  heteromerní (Lynch, 2004).

Naše elektrofyziologické pokusy dále prokázaly, že presynaptické i postsynaptické funkční GlyR v MNTB obsahují podjednotku  $\alpha 1$ . GlyR byly totiž citlivé k přítomnosti CTB, ale aplikace CTZ ( $\alpha 2$  blokátor) či PXN ( $\alpha 3$  blokátor) neměla na jejich aktivitu významný vliv (Pribilla et al., 1992; Rundström et al., 1994; Wang et al., 2007; Yang et al., 2007). Podjednotka  $\alpha 1$  byla následně přímo lokalizována pomocí konfokální a imunoelektronové mikroskopie v plazmatické membráně Heldových kalichů a postsynaptických hlavních neuronů (Hruskova et al., 2012; Trojanova et al., 2014). Tato zjištění jsou v souladu s nalezením glycinem aktivované  $\sim 90$  pS jednotkové vodivosti při snímání z membránových terčů vytržených z Heldových kalichů (Turecek and Trussell, 2002). V heterologních expresních systémech a u nativních neuronů bylo ukázáno, že na základě jednotkové vodivosti (Takahashi et al., 1992; Bormann et al., 1993) a kinetiky desenzitizace a deaktivace (Legendre et al., 2002; Mohammadi et al., 2003) lze elektrofyziologicky odlišit  $\alpha 1$  homomerní formu GlyR od forem obsahujících ostatní podtypy podjednotky  $\alpha$  i od těch obsahujících podjednotku  $\beta$ . Výše uvedené vlastnosti homomerních receptorů je mohou předurčovat ke schopnosti odpovídat na nízké koncentrace endogenního agonisty (Muller et al., 2008). V souladu s těmito předpoklady ukázala naše předchozí zkoumání aktivaci presynaptických GlyR zbytkovým agonistou unikajícím ze sousedních inhibičních synapsí (tzv. spillover) (Turecek and Trussell, 2001). K tomuto mechanismu aktivace však přispívá i specifická distribuce GlyR do kaliceálních výběžků těsně přiléhajících ke glycinergním aktivním zónám (Trojanova et al., 2014).

Synapticky aktivované GlyR vytvářely membránové shluky heteromerních komplexů obsahujících podjednotky  $\alpha 1$  a  $\beta$ . Charakteristickou vlastností  $\alpha 1\beta$  heteromerů je jejich rychlá kinetika aktivace/deaktivace a jsou tedy výborně uzpůsobeny pro fáziký synaptický přenos.

Není proto překvapující, že tyto receptory slouží v řadě oblastí CNS k zajišťování rychlé postsynaptické inhibice (Singer and Berger, 2000; Legendre, 2001; Burzomato et al., 2004; Muller et al., 2008). V MNTB jsou navíc shluky synaptických GlyR uspořádány do růžicovitých útvarů, které těsně přiléhají k vGAT-pozitivním presynaptickým zakončením jednoho rozvětveného glycinergního vlákna (Hruskova et al., 2012; Trojanova et al., 2014). V souladu s těmito molekulárními a morfologickými vlastnostmi inhibičního přenosu v MNTB se spontánní a evokované IPSC u hlavních neuronů vyznačují vysokými amplitudami a velmi rychlou kinetikou (Awatramani et al., 2004; Leao et al., 2004; Awatramani et al., 2005a; Lu et al., 2008). To umožňuje glycinergnímu přenosu sledovat jednotlivé senzorické stimuly až do frekvence 500 Hz (Awatramani et al., 2004). Další důležitou vlastností synaptických GlyR je to, že zcela neodpovídají na zbytkový glycin nahromaděný v synaptické štěrbině při vysokofrekvenční stimulaci. To je pravděpodobně způsobeno jejich nižší potenci, protože experimentální zvýšení afinity GlyR pomocí ICS205,930 (Chesnoy-Marchais, 1996; Supplisson and Chesnoy-Marchais, 2000) vedlo ke zvýšení amplitudy tonického IPSC u hlavních neuronů. Snížená citlivost synaptických/extrasynaptických GlyR k nízkým koncentracím glycinu tak minimalizuje tonické IPSC a může představovat adaptivní mechanismus přenosu zprostředkovaného  $\alpha 1\beta$  heteromerními GlyR. Tato vlastnost inhibičních GlyR může být klíčová právě u námi studovaných synapsí sluchové dráhy. Bylo totiž ukázáno, že experimentálně navozená tonická inhibice narušuje přesné zpracování zvukem vyvolaných odpovědí v rámci sluchového mozku kmene (Pecka et al., 2008). Na rozdíl od mIPSC, tonických IPSC a vysokofrekvenčních fázikých IPSC, ICS205,930 neovlivnil amplitudu jednotlivých nízkofrekvenčních IPSC. Podobná pozorování byla v minulosti učiněna s použitím dalšího pozitivního alosterického modulátoru GlyR zinku a pravděpodobné vysvětlení je, že synaptické GlyR jsou při těchto odpovědích saturovány glycinem (Laube et al., 2002). To je zajímavé, protože účinná synaptická koncentrace dosažitelná výlevem jednotlivých kvant glycinu není dostatečná pro saturaci postsynaptických receptorů (Suwa et al., 2001; Mangin et al., 2003; Rigo et al., 2003; Beato, 2008). Obsazenost GlyR však může být zvýšena laterální difúzí agonisty z těsně sousedících uvolňovacích míst a tak může docházet ke zvýšení amplitudy jednotlivých evokovaných IPSC (Faber and Korn, 1988). V souladu s touto představou byla námi pozorovaná doba nástupu evokovaného IPSC o něco pomalejší než bylo dříve ukázáno pro mIPSC (Lim et al., 2003; Lu et al., 2008). Je ale možné, že k tomuto jevu přispívá i časový průběh exocytózy jednotlivých synaptických váčků. Citlivost glycinových receptorů ke glycinu difundujícímu z okolí je též různá pro různé ligandované stavy receptoru (Burzomato et al., 2004). Zvýšení afinity GlyR ke glycinu po přidání ICS250, 930 by pak zvýšilo amplitudy tonických a následně

i vysokofrekvenčních fázikých IPSC. K potvrzení této hypotézy bude nutné provést další pokusy.

Z našich pokusů uzavíráme, že postsynaptické receptory v MNTB citlivě sledují kinetiku uvolňování přenašeče, což odpovídá jejich úloze při fázikém přenosu. Toto kontrastuje s funkcí vysokoafinitních presynaptických receptorů na Heldově kalichu heterosynapticky aktivovaných difúzí glycinu z inhibičních zakončení (Turecek and Trussell, 2001; Kopp-Scheinpflug et al., 2008). Na synapsi Heldova kalichu lze tedy vidět, že nepřítomnost versus přítomnost  $\beta$  podjednotky v receptorovém oligomeru určuje tonický versus fáziký charakter glycinergního přenosu v centrálním nervovém systému (Betz and Laube, 2006).

## **5.2. Vliv kochleární aktivity na vývojové změny inhibičního systému v MNTB**

Inhibiční systém savčího mozkového kmene a míchy vykazuje během dozrávání výrazné změny, při kterých dochází k přechodu z GABAergního charakteru na glycinergní. U potkana se většina těchto změn odehrává během prvních 2-3 týdnů života (Gao et al., 1998; Kotak et al., 1998; Korada and Schwartz, 1999; Turecek and Trussell, 2002; Awatramani et al., 2005a). V MNTB potkanů starých 5-7 dní dominuje GABAergní inhibice působící prostřednictvím pre- a postsynaptických GABA<sub>A</sub> a GABA<sub>B</sub> receptorů (Isaacson, 1998; Turecek and Trussell, 2002). Během následujících dnů jsou presynaptické GABA<sub>A</sub> receptory (ale ne postsynaptické GABA<sub>A</sub> receptory) postupně nahrazovány GlyR a hlavním inhibičním přenašečem v MNTB se stává glycin (Turecek and Trussell, 2002; Awatramani et al., 2005a). Důsledkem změn je zrychlená kinetika a výrazné zvýšení amplitudy IPSC a divergence pre- a postsynaptických mechanismů synaptické plasticity (Turecek and Trussell, 2002; Awatramani et al., 2005a). Vzhledem k tomu, že zásadní změny v inhibičním systému MNTB časově odpovídají nástupu slyšení potkana (kolem P11), předpokládali jsme, že by alespoň z části mohly být vyvolány zvýšenou kochleární aktivitou.

Vliv senzorické aktivity na vývoj sluchového systému byl v minulosti často zkoumán pomocí uni- a bilaterální kochleární ablace. Ukázalo se, že tento zásah měl významný vliv na vývojové změny v expresi membránových receptorů či dalších proteinů zúčastněných ve zpracování zvukových signálů ve sluchové dráze mozkového kmene (Swearengen et al., 1993; Potashner et al., 2000; Martinez-Galan et al., 2007). Bylo např. ukázáno, že jednostranná kochleární ablace vedla u mladých morčat k utlumení glycinergní inhibice v ipsilaterálních AVCN a PVCN a LSO. V kontralaterálním LSO byla po kochleotomii inhibice naopak zesílena.

(Suneja et al., 1998a; Suneja et al., 1998b; Yan et al., 2007). Tyto změny byly u fretky navíc provázeny sníženou expresí calretininu a nedostatečnou synaptogenezí (Fuentes-Santamaria et al., 2005). Došlo též k bilaterálnímu zeslabení inhibice v dorzálním kochleárním jádře a zesílení inhibice v oboustranných MSO (Suneja et al., 1998a).

Námi provedené oboustranné kochleární ablace ovlivnily zejména vývojové změny v expresi inhibičních receptorů na Heldově kalichu. Na rozdíl od kontrolních zvířat, která v během druhého postnatálního týdne vykazovala nárůst exprese GlyR na úkor GABA<sub>A</sub> receptorů (Turecek and Trussell, 2002), u zvířat po kochleotomii přetrvávala zvýšená exprese presynaptických GABA<sub>A</sub> receptorů a exprese GlyR byla nízká. Oproti tomu neměla bilaterální kochleotomie významný vliv na poměrná zastoupení GABA<sub>A</sub> receptorů a GlyR na somatodendritických částech GBC v AVCN a hlavních neuronů v MNTB. Došlo však k významnému snížení celkového množství inhibičních receptorů exprimovaných těmito buňkami, jak bylo patrné z nižší proudové hustoty odpovědí vyvolaných aplikací glycinu a GABA na hlavní neurony a z nižší amplitudy IPSC. V souladu s tímto pozorováním předcházející imunohistochemické pokusy z naší laboratoře ukázaly, že u dva týdny starých kochleotomizovaných potkanů došlo k poklesu počtu shluků GlyR na hlavních neuronech a k redukci vGAT-pozitivních boutonů (Trojanova, 2014). IPSC kochleotomizovaných zvířat však navíc vykazovaly pomalejší kinetiku a sníženou citlivost k antagonistům GlyR. Je proto pravděpodobné, že inhibiční vlákna nebyla čistě glycinergní a uvolňovala i významné množství GABA.

Snížení počtu GlyR a vGAT-pozitivních boutonů po kochleotomii bylo pouze přechodné, jak ukázaly další imunohistochemické pokusy, provedené na dvouměsíčních potkanech. Navíc kochleotomie neměla vliv na podjednotková složení a subcelulární distribuci postsynaptických GlyR (Trojanova 2014). Z toho vyvozujeme, že senzorická aktivita má ve vývoji inhibičního systému důležitou úlohu, ale že zde působí i další vlivy, které ji mohou zastoupit. Jedním z faktorů výrazně ovlivňujících vývoj sluchového systému je spontánní kochleární aktivita. Ta je přítomna již velmi časně po narození (před provedením kochleární ablace) a způsobuje nadprahové výboje u neuronů dolních etáží sluchového systému, včetně MNTB (Lippe, 1994; Lu et al., 2007; Blankenship and Feller, 2010; Tritsch et al., 2010). Další možností je trofická úloha postsynaptických neuronů při maturaci nediferencovaných nervových vláken. Bylo např. ukázáno, že tzv. bone morphogenetic protein (BMP) uvolňovaný z hlavních neuronů retrogradně stimuluje zrání Heldova kalichu a morfologii celé Heldovy synapse (Xiao et al., 2013). Naše pokusy tak jasně prokázaly stimulační vliv senzotické aktivity na vývoj inhibice v MNTB a k odhalení dalších faktorů bude nutné provést doplňující pokusy.



### 5.3. Modulační vliv presynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů na aktivitu neuronů myšího MNTB *in vivo*

Presynaptická inhibice zprostředkovaná GABA<sub>B</sub> receptory byla nalezena u excitačních i inhibičních synapsí z téměř všech oblastí mozku (Chalifoux and Carter, 2011). Většina prací studujících funkci presynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů využívala *in vitro* preparáty nebo akutně izolované mozkové řezy. Není mnoho prací, které jasně prokázaly GABA<sub>B</sub> závislou inhibici u jednotlivých neuronů *in vivo* (Mazo et al., 2016). Jedním z důvodů jsou technické obtíže spojené s identifikací presynaptické složky v záznamech jednotkové aktivity. Výhodou Heldovy synapse je jednoduchý a dobře definovaný vztah mezi vstupem a výstupem, což do značné míry snižuje pravděpodobnost příspěvku aktivity okolních neuronů k signálu snímanému z jednoho hlavního neuronu. Také proto Heldova synapse představuje často využívaný modelový systém výzkumu synaptických mechanismů. My jsme ji využili ke studiu presynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů.

Zjistili jsme, že iontoforetická aplikace agonisty GABA<sub>B</sub> receptoru baclofenu v saturující koncentraci snižovala u mladých dospělých potkanů sílu excitačního synaptického přenosu zhruba o 40%. V dřívějších studiích provedených na mozkových řezech však bylo možno pozorovat vyšší, 80 – 90% inhibici EPSC (Isaacson, 1998; Takahashi et al., 1998; Kajikawa et al., 2001). Tyto práce byly prováděny na dvou až třítýdenních zvířatech na rozdíl od dvouměsíčních myší s dokončeným vývojem, které byly použity v našich pokusech. Nižší efekt aktivace GABA<sub>B</sub> receptorů na excitační přenos by tak z části mohl být způsoben vývojovým poklesem v expresi GABA<sub>B</sub> receptorů obecně pozorovaným v centrálním nervovém systému (Malitschek et al., 1998; Fritschy et al., 1999). Snížení exprese GABA<sub>B</sub> receptorů během postnatálního vývoje bylo ukázáno i ve sluchovém kmeni (Hassfurth et al., 2010). Dalším z faktorů ovlivňujícím míru presynaptické inhibice je pravděpodobnost uvolnění synaptických váček. Bylo ukázáno, že na Heldově synapsi klesá pravděpodobnost uvolnění glutamátu v průběhu dozrávání centrálního nervového systému (Taschenberger et al., 2002; Kushmerick et al., 2004). Nízká bazální pravděpodobnost uvolnění by pak zapříčinila i nižší relativní efekt baclofenu na amplitudu EPSC u starších zvířat *in vivo*. Vysvětlení proč sekrece glutamátu na Heldově synapsi *in vivo* probíhá s nízkou pravděpodobností zatím nebylo spolehlivě pobádáno. Jedním z důvodů může být to, že studie na mozkových řezech byly prováděny v promývacích roztocích obsahujících vyšší koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů (zpravidla 2 mM), než je jejich předpokládaná koncentrace *in vivo* (Borst, 2010). Vzhledem k tomu, že množství uvolněného mediátoru je 3-4 mocninnou funkcí extracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup>

(Schneppenburger et al., 1999), mohou být rozdíly v hladinách  $\text{Ca}^{2+}$  jedním ze zdrojů odlišností mezi výsledky pokusů prováděných na řezech a *in vivo*. Dále nelze pominout potenciální příspěvek dalších typů metabotropních receptorů přítomných na Heldově kalichu a tonicky aktivovaných endogenními agonisty *in vivo*. Jedná se o např. metabotropní glutamátové receptory (Takahashi et al., 1996) či  $\alpha 2$  adrenergní receptory (Leão and Von Gersdorff, 2002). Ty k přenosu signálů využívají inhibiční G-protein a tak jako  $\text{GABA}_B$  receptory regulují sekreci neurotransmiterů inhibicí presynaptických VGCC. V dřívějších studiích prováděných na mozkových řezech bylo zjištěno, že  $\text{GABA}_B$  receptory jsou v různých oblastech mozku tonicky aktivovány zbytkovou extracelulární koncentrací GABA (Emri et al., 1996; Aroniadou-Anderjaska et al., 2000; Wu et al., 2011). Zajímalo nás, zda je tento mechanismus aktivace  $\text{GABA}_B$  receptorů přítomný i v MNTB za podmínek *in vivo* a zda může být odpovědný za nízkou bazální pravděpodobnost uvolnění glutamátu. Zjistili jsme, že iontoforetická aplikace antagonisty  $\text{GABA}_B$  receptoru CGP54626 nevedla ke zvýšení spontánní aktivity MNTB neuronů, což naznačilo, že zbytková extracelulární koncentrace GABA je příliš nízká na to, aby měřitelně aktivovala  $\text{GABA}_B$  receptory. Není pravděpodobné, že by byla neúčinnost CGP54626 způsobena nedostatečnou funkcí iontoforetického aplikačního systému dodávajícího příliš nízkou koncentrací této látky do místa snímání. Bylo ukázáno, že už při velmi nízkých koncentracích (1-2  $\mu\text{M}$ ) je CGP54626 schopna kompletně anulovat efekt 50-100  $\mu\text{M}$  baclofenu na pre- i postsynaptických receptorech v CA3 oblasti hipokampu (Guetg et al., 2009). Koncentrace CGP54626 v našich pokusech byly přinejmenším srovnatelné a kontrolní pokusy navíc prokázaly, že tento antagonist byl schopen zabránit inhibičnímu vlivu baclofenu, pokud byly tyto látky aplikovány společně.

Mechanismy odpovědné za udržování nízké bazální koncentrace GABA v MNTB nejsou známy. Mohou zahrnovat aktivitu gliových a neuronálních GABA přenašečů (Roth and Draguhn, 2012), které však zatím v MNTB identifikovány nebyly. V mozkovém kmeni obecně převládá gliový transportér GAT3 (Durkin et al., 1995; Höfner and Wanner, 2004), a na astrocytech v LSO byl navíc nalezen i transportér GAT1 (Stephan and Friauf, 2014). Bylo ukázáno, že pre- i postsynaptické neurony tvořící Heldovu synapsi jsou obaleny výběžky astroglie (Renden et al., 2005; Ford et al., 2009). Je proto možné, že extracelulární koncentrace GABA je pod kontrolou GAT1 nebo GAT3 exprimovaných na těchto výběžcích. K objasnění těchto mechanismů budou potřeba další pokusy zahrnující např. imunohistochemické značení přenašečů na řezech MNTB či sledování změn síly synaptického přenosu v MNTB po aplikaci antagonistů GABA transportu. Koncentrace extracelulární GABA závisí též na její aktuální koncentraci uvnitř buněk. Nepředpokládá se, že by intracelulární koncentrace GABA v buňkách

SOC byly u dospělých zvířat příliš vysoké (Hassfurth et al., 2010). Zdroj a způsob uvolňování GABA a fyziologická aktivace GABA<sub>B</sub> receptorů v MNTB je tak stále nedořešenou otázkou. Naše pokusy ukázaly, že během spontánní aktivity MNTB neuronů je koncentrace GABA nízká, avšak nemůžeme vyloučit zvýšení její koncentrace za specifických podmínek, např. během určitého typu zvukové stimulace. Potenciálním zdrojem by pak mohla být inhibiční zakončení MNTB, kde byla přítomnost a společné uvolňování GABA a glycinu nalezena i u téměř dospělého potkana (P23) (Moore and Moore, 1987; Lu et al., 2008). Heterosynaptická aktivace GABA<sub>B</sub> receptorů na Heldových kališích GABA uvolněnou z inhibičních zakončení by tak mohla představovat jeden ze způsobů fyziologické aktivace GABA<sub>B</sub> receptorů. Vzhledem k blízké přítomnosti gliových výběžků u Heldovy synapse by alternativním vysvětlením mohlo být uvolňování GABA z gliových buněk pomocí reverzního transportu (Volterra and Meldolesi, 2005). Nelze vyloučit ani Ca<sup>2+</sup> závislé uvolnění GABA ze somatodendritických částí hlavních neuronů (Magnusson et al., 2008) a syntéza a uvolňování GABA gliovými buňkami byla již také prokázána (Yoon et al., 2014). Alternativním endogenním agonistou GABA<sub>B</sub> receptorů na Heldově kalichu je taurin (Kontro and Oja, 1990), jehož přítomnost v mozковém kmeni byla v minulosti potvrzena (Saransaari and Oja, 2006).

#### **5.4. Modulace excitačního synaptického přenosu v MNTB postsynaptickými GABA<sub>B</sub> receptory**

Mechanismy interakce mezi složkami excitačního a inhibičního přenosu mohou být velmi komplexní a často zahrnují kaskády dějů, které se vyznačují přesným načasováním a kolokalizací ve specifických buněčných kompartmentech. Naše pokusy ukázaly, že postsynaptické GABA<sub>B</sub> receptory na hlavních neuronech MNTB regulují aktivitu VGCC typu N a P/Q a tím inhibují mAHP postsynaptických akčních potenciálů zprostředkovanou otevřením Ca<sup>2+</sup>-aktivovaných SK kanálů. Tento GABA<sub>B</sub> závislý mechanismus vede k snadnějšímu vyvolávání akčních potenciálů opakujícími se a jinak podprahovými excitačními stimuly. Dřívější pokusy provedené na mozkových řezech MNTB ukázaly, že opakovaná vysokofrekvenční presynaptická aktivita vede k vyčerpání synaptických váček připravených k okamžitému uvolnění (tzv. readily releasable pool) a k přechodné depresi synaptických proudů (Taschenberger and von Gersdorff, 2000; von Gersdorff and Borst, 2002). Deprimované EPSP se pak vyznačují podprahovými amplitudami, zejména pokud jsou vyvolány během AHP předcházejícího AP. Baclofen významně zvyšoval četnost AP ve frekvenčním rozmezí 100-400 Hz. Jeho efekt byl nejvýraznější při frekvenci 100 Hz a se zkracujícími se intervaly

mezi stimuly se postupně snižoval. To bylo v souladu s naším pozorováním, že amplituda mAHP dosahovala svého maxima v čase kolem 10 ms po nástupu AP. Podobný efekt somatických GABA<sub>B</sub> receptorů, zkracující refrakterní složku postsynaptických AP, byl pozorován v preoptické oblasti hypothalamu potkana (Kolaj et al., 2004). Autoři zde prokázali baclofenem zprostředkovanou inhibici VGCC kanálů typu N a následně SK závislé mAHP, což vedlo ke zvýšení frekvence nadprahové postsynaptické aktivity.

Inhibice mAHP baclofenem vyžadovala spřažení GABA<sub>B</sub> receptorů s VGCC a současně VGCC vyvolaného vápníkového signálu s SK kanály. Selektivní spřažení SK kanálů s jedním či více typy VGCC je poměrně běžným jevem. Bylo ukázáno např. v dopaminergních jádrech středního mozku (spřažení s T-typem VGCC) či v Purkyňových buňkách mozečku (s VGCC typu P/Q a T) (Swensen and Bean, 2003; Womack et al., 2004). Je zajímavé, že předchozí práce našly u hlavních neuronů MNTB vyšší hustotu Ca<sup>2+</sup> proudů zprostředkovaných P/Q kanály než těch tekoucích přes kanály typu N (Barnes-Davies et al., 2001). Naše výsledky však ukázaly nejvyšší podíl  $\omega$ -conotoxin GVIA-citlivé složky na celkové amplitudě mAHP.  $\omega$ -agatoxin IVA, nimodipin a mibefradil, které specificky blokují VGCC typu P/Q, L a T (McCarthy and TanPiengco, 1992; Mehrke et al., 1994) měly na mAHP buď nižší nebo jen nevýznamný vliv. To ukazovalo na preferenční spřažení SK kanálů s VGCC typu N. To by mohlo být způsobeno např. specifickým rozmístěním SK kanálů a VGCC v rámci membránových mikrodomén. Podobné selektivní spřažení K<sub>Ca</sub> s určitým typem VGCC bylo ukázáno u hipokampálních neuronů, kde jsou SK kanály aktivovány VGCC typu L, zatímco BK kanály jsou aktivovány vtokem Ca<sup>2+</sup> přes VGCC typu N. Tyto neurony exprimují navíc i kanály typu P/Q, ale jejich aktivace nevede ke stimulaci K<sub>Ca</sub> proudů (Marrion and Tavalin, 1998). Představa těsné kolokalizace VGCC a SK byla podpořena i rozdílným efektem EGTA a BAPTA na amplitudu mAHP. EGTA se totiž vyznačuje pomalejší kinetikou vazby dvojmocných kationtů a není proto schopná účinně bránit rychlému zvýšení intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> v těsném okolí VGCC (Marty and Neher, 1985).

Významným přínosem našich výsledků je to, že identifikovaly SK kanály jako důležitý a dříve nerozpoznaný faktor ovlivňující excitabilitu hlavních neuronů MNTB. To plynulo z citlivosti mAHP k apaminu, selektivnímu inhibitoru SK kanálů (Blatz and Magleby, 1986; Grunnet et al., 2001; Pedarzani et al., 2005; Hongyuan et al., 2016). MNTB tak rozšířilo seznam oblastí mozku, u nichž aktivace SK kanálů představuje jeden hlavních mechanismů ovlivňujících frekvenci synaptického přenosu (Bond et al., 2005; Adelman et al., 2012). Zajímavé je, že jiné Ca<sup>2+</sup> aktivované K<sup>+</sup> kanály pravděpodobně k AHP v MNTB nepřispívají. To

plynulo z necitlivosti AHP k iberiotoxinu a nimodipinu, blokátorů BK a IK kanálů (Galvez et al., 1990; Jiang et al., 2007).

V centrální nervové soustavě se vyskytují tři podtypy podjednotek SK (SK1, SK2, SK3) (Sailer et al., 2004). V komplexu olivy superior byly nalezeny mRNA pro SK1 a SK2 (Stocker and Pedarzani, 2000), ale imunohistochemicky byla prokázána povrchová exprese pouze u podjednotky SK2 (Sailer et al., 2004). Z důvodu nedostupnosti podjednotkově selektivních modulátorů SK kanálů jsme používali myši s vyřazenou expresí genů pro SK podjednotky a sledovali u nich přítomnost mAHP a její citlivost k látkám ovlivňujícím aktivitu SK kanálů. Zjistili jsme, že delece podjednotky SK1 neměla na amplitudu mAHP výrazný vliv. Apamin a NS309 (pozitivní selektivní modulátor SK) modulovaly mAHP způsobem srovnatelným s jejich efektem na mAHP u neuronů divokého typu. Naopak neurony bez podjednotky SK2 nebyly schopny generovat mAHP a apamin či NS309 neměly na průběh AP žádný vliv. Naše výsledky tak ukázaly, že SK kanály zprostředkující mAHP u hlavních neuronů obsahovaly podjednotku SK2. Tento závěr byl podpořen také zjištěním, že většina hlavních neuronů MNTB byla silně imunopozitivní na SK2. Některé neurony však překvapivě vykazovaly i imunoreaktivitu na SK1. To naznačilo, že SK kanály zprostředkující mAHP mohly být tvořeny buď jako homooligomery SK2 nebo jako heteromery SK1/SK2. Heteromerizace SK kanálů není doposud důkladně prozkoumána. Původní představy podpořené např. biochemickou analýzou se přikláněly k čistě homomerním kombinacím podjednotek při tvorbě SK kanálů, a to i v případě koexprese různých podjednotek v jedné oblasti centrálního nervového systému (Sailer et al., 2002). Později byla na základě molekulárně biologických manipulací prokázána možnost tvorby heteromerních SK kanálů složených z podjednotek SK1 a SK2 v heterologních expresních systémech (Ishii et al., 1997; Benton et al., 2003) i u neuronů centrální nervové soustavy (Strassmaier et al., 2005). Možnost exprese heteromerních SK kanálů na hlavních neuronech MNTB není v rozporu s námi pozorovanou nepřítomností mAHP u SK2 KO myši. Bylo totiž ukázáno, že podjednotka SK1 exprimovaná samostatně netvoří funkční kanál, ale zůstává lokalizovaná intracelulárně. Pouze koexprese SK1 s podjednotkou SK2 vede ke vzniku membránových proudů o měřitelné amplitudě (Benton et al., 2003). Otázkou zůstává absence vlivu delece SK1 na amplitudu nebo časový průběh mAHP. Pokud SK1/SK2 heteromery tvoří významnou část populace SK kanálů na neuronech MNTB, pak by jejich nepřítomnost měla vést k významnému snížení mAHP. Je proto možné, že absence SK1/SK2 heteromerů u SK1 KO myši mohla být kompenzována zvýšenou expresí SK2 homomerických kanálů. Adaptační mechanismy jsou u myši s konstitutivně vyřazenou expresí určitého genu dnes již poměrně

známým fenoménem (Reyes et al., 2017). Ke konečnému vyřešení otázky podjednotkového složení SK kanálů v MNTB tak budou třeba ještě další pokusy.

Závěrem by bylo vhodné zmínit, že GABA<sub>B</sub> receptory a jiné GPCR mohou ovlivňovat aktivitu SK kanálů i jinak než mechanismem zahrnujícím inhibici VGCC. V senzorických neuronech byla například pozorována modulace SK kanálů adrenergními receptory prostřednictvím protein kinázy 2 a fosforylací kalmodulinu (Maingret et al., 2008). Podobně bylo ukázáno u dopaminergních neuronů *substantia nigra*, že aktivace GABA<sub>B</sub> receptoru způsobila snížení pravděpodobnosti otevření SK kanálů v závislosti na změnách koncentrace cAMP a aktivity protein kinázy A (Estep et al., 2016). Tyto VGCC nezávislé mechanismy modulace však v MNTB pravděpodobně nehrají významnou roli, protože baclofen nebyl schopen modulovat aktivitu SK kanálů stimulovaných aktivitou Ca<sup>2+</sup> propustných NMDA receptorů.

## 6. Závěry:

1. GlyR vyskytující se na Heldově synapsi v MNTB potkana tvoří dvě populace odlišující se podjednotkovým složením, buněčnou distribucí a funkcí. Postsynaptické receptory vytváří na somatodenritických částech hlavních neuronů  $\alpha 1\beta$  heteromerní shluky, které kolokalizují s vGAT pozitivními inhibičními terminály a zprostředkují IPSC s velmi rychlou kinetikou. Receptory exprimované presynaptickými neurony jsou dvojího typu: GlyR na tělech a dendritech GBC v AVCN, vyznačující se totožnými vlastnostmi jako postsynaptické receptory u hlavních neuronů MNTB, a kaliceální GlyR tvořené jako náhodně rozptýlené homomery složené z podjednotek  $\alpha 1$ . Heterosynaptická aktivace kaliceálních receptorů glycinem unikajícím ze sousedních inhibičních zakončení zvyšuje sekreci glutamátu z Heldova kalichu.

2. Oboustranná kochleární ablace provedená během prvního postnatálního týdne života potkana vedla k oddálení vývojových změn, které inhibice v MNTB normálně prodělává v období těsně po nástupu slyšení (kolem 11 dne). Přerušení kochleární aktivity způsobilo nedostatečný přechod charakteru inhibice z GABA<sub>A</sub>ergního na glycinergní a projevilo se snížením celkové exprese GABA a glycinových receptorů na tělech postsynaptických neuronů MNTB. Přirozená senzorická aktivita tedy hraje významnou úlohu při utváření a zrání inhibičního systému v MNTB savců.

3. Prokázali jsme existenci mechanismu odpovědného za modulaci excitačního synaptického přenosu v MNTB *in vivo* a zahrnujícího aktivitu GABA<sub>B</sub> receptorů exprimovaných na povrchu Heldových kalichů. Presynaptické GABA<sub>B</sub> receptory nevykazují *in vivo* významnou konstitutivní aktivitu a regulují krátkodobou synaptickou plasticitu na Heldově synapsi snižováním pravděpodobnosti uvolnění glutamátergních synaptických váčků.

4. Postsynaptické GABA<sub>B</sub> receptory na hlavních neuronech MNTB regulují aktivitu VGCC typu N a P/Q a tím inhibují mAHP postsynaptických akčních potenciálů zprostředkovanou otevřením  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivovaných SK kanálů (především homomerů SK2 podjednotek). Tento mechanismus vede ke snadnějšímu vyvolávání akčních potenciálů stimuly opakujícími se s frekvencí 100-400Hz. Postsynaptické GABA<sub>B</sub> receptory tak překvapivě zvyšují spolehlivost excitačního synaptického přenosu.

## Abstrakt

GABA a glycin představují nejvýznamnější inhibiční přenašeče v CNS. Svůj vliv uplatňují prostřednictvím ionotropních a metabotropních receptorů, které tvoří oligomerní komplexy v plazmatické membráně neuronálních buněk. Farmakologické vlastnosti, distribuce a tím i funkce GABA a glycinových receptorů závisí na jejich podjednotkovém složení. Cílem předkládané práce bylo nalézt podjednotková složení a fyziologickou úlohu ionotropních glycinových a metabotropních GABA<sub>B</sub> receptorů na neuronech mediálního jádra trapézovitého tělesa, MNTB. Toto jádro je součástí sluchové dráhy v mozkovém kmeni savců a vyznačuje se dobře definovanými excitačními a inhibičními vstupy. Excitační vlákna tvoří v MNTB obří glutamatergní nervová zakončení, tzv. Heldovy kalichy, zatímco inhibiční vlákna končí jako drobné GABA/glycinergní butony. Oba typy aferentních vláken inervují somatodentritické části hlavních neuronů MNTB a toto jádro tak představuje vhodný modelový systém pro studium molekulárních a buněčných mechanismů interakcí mezi synaptickou excitací a inhibicí.

Naše pokusy jsme provedli s použitím elektrofyziologických a imunohistochemických metod. Pro snímání membránových proudů a potenciálů neuronů v živých řezech MNTB potkana nebo myši jsme používali techniku terčíkového zámku. Zvukem vyvolanou aktivitu neuronů v MNTB myši jsme snímali in vivo juxtacelulárně technikou tzv. volného terčíku. Lokalizaci receptorů v nativní tkáni potkanů nebo myši jsme pak sledovali pomocí značení fluorescenčními protilátkami a konfokální mikroskopie.

Zjistili jsme, že glycinové receptory jsou v MNTB zastoupeny dvěma funkčně odlišnými populacemi. Presynaptické receptory jsou na povrchu Heldových kalichů volně rozptýleny jako homomery podjednotek  $\alpha 1$  a vyvolávají postupnou potenciaci intenzity glutamatergního přenosu. Naopak postsynaptické receptory tvoří na tělech a dendritech hlavních neuronů shluky  $\alpha 1\beta$  heteromerních komplexů a zprostředkují rychlou a fázičnou postsynaptickou inhibici. Naše výsledky tak ukázaly, že cílená exprese podjednotky  $\beta$  ve specifických buněčných oddílech vede k segregaci podtypů glycinových receptorů zapojených v různých mechanismech modulace síly přenosu na synapsi centrálního typu. Dále jsme zjistili, že přirozená kochleární aktivita hraje důležitou úlohu při spouštění změn v typu inhibičního neuropřenašeče a v expresi pre- a postsynaptických inhibičních receptorů v MNTB během časného postnatálního vývoje.



Druhá část pokusů byla zaměřena na mechanismy účinku pre- a postsynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů na neuronech MNTB. Podařilo se nám prokázat, že GABA<sub>B</sub> exprimované na Heldových kališích kontrolují sekreci glutamátu při spontánní a zvukem vyvolané aktivitě neuronů MNTB dospělé myši. Zároveň jsme vyloučili tonickou aktivaci presynaptických GABA<sub>B</sub> zbytkovou koncentrací endogenního agonisty jako dříve uvažovanou příčinu nízké pravděpodobnosti uvolňování glutamátergních váčků z Heldova kalichu. Postsynaptické GABA<sub>B</sub> receptory na hlavních neuronech MNTB regulují aktivitu napětím-řízených Ca<sup>2+</sup> kanálů typu N a P/Q. To má za následek inhibici střední posthyperpolarizační fáze postsynaptických akčních potenciálů, zprostředkované otevíráním Ca<sup>2+</sup> aktivovaných SK kanálů. Tento GABA<sub>B</sub> závislý mechanismus vede ke snadnějšímu vyvolávání akčních potenciálů opakujících s vysokou frekvencí. Postsynaptické GABA<sub>B</sub> receptory, které jsou všeobecně považovány za jedny z nejvýznamnějších regulátorů neuronální excitability, tak v MNTB savců plní specifickou funkci zvyšováním spolehlivosti excitačního synaptického přenosu.



## Abstract

GABA and glycine are major inhibitory neurotransmitters in the central nervous system. They act on ionotropic and metabotropic receptors that form oligomeric complexes in plasma membrane of neuronal cells. Pharmacological properties, subcellular distribution and function of GABA and glycine receptors depend on their subunit composition. The thesis was aimed to find subunit composition and physiological role of ionotropic glycine and metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors in neurons of medial nucleus of trapezoid body, MNTB. The nucleus resides in the mammalian auditory brainstem and it is characterized by well defined excitatory and inhibitory inputs. Excitatory fibers form giant glutamatergic nerve terminals, calyces of Held, whereas inhibitory fibers form small GABA/glycinergic boutons. Both types of afferents innervate somatodendritic parts of MNTB principal neurons. The nucleus thus represents a suitable model for studying molecular and cellular mechanisms of interactions between excitation and inhibition.

Our experiments were performed using electrophysiology and immunohistochemistry methods. Patch clamp technique was used to record membrane currents and voltages from neurons in live MNTB slices isolated from rats or mice. Spontaneous and sound-evoked activity of murine MNTB neurons was recorded by in vivo juxtacellular recording of extracellular field potentials. Localization of receptors immunolabelled with specific antibodies was studied using confocal microscopy.

We found two functionally different glycine receptor populations in the rat MNTB. Postsynaptic receptors formed  $\alpha 1/\beta$ -containing clusters on somatodendritic domains of MNTB principal neurons, colocalizing with glycinergic nerve endings to mediate fast, phasic inhibitory postsynaptic currents. In contrast, presynaptic receptors on glutamatergic calyx of Held terminals were composed of dispersed, homomeric  $\alpha 1$  receptors, triggering slow potentiation of glutamatergic transmission. These results suggest that specific targeting of glycine receptor  $\beta$ -subunit produces segregation of the receptor subtypes involved in two different mechanisms of modulation of synaptic strength. We have also revealed that normal cochlear activity is important for initiation of developmental changes in inhibitory transmitter subtype and expression level of pre- and postsynaptic inhibitory receptors in the rat MNTB.

The second part of the thesis was focused on mechanisms of action of pre- and postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptors in the mouse MNTB. We have shown that GABA<sub>B</sub> expressed on

calyces of Held control both spontaneous and sound-evoked discharges of MNTB neurons in adult mice. Results of these experiments have also disproved the idea of constitutive activity of presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors causing low basal release probability at the calyx of Held synapse. Postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptors expressed in MNTB principal neurons were found to be regulating the activity of N- and P/Q-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. Subsequently, the postsynaptic action potential medium afterhyperpolarization phase mediated by opening of Ca<sup>2+</sup>-activated SK channels was strongly reduced in the presence of baclofen, GABA<sub>B</sub> receptor agonist. When postsynaptic spikes were repeatedly evoked at high frequencies, such GABA<sub>B</sub> activity actually induced higher postsynaptic firing rates of MNTB neurons. In this way, postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptors, generally considered as important regulators of basal neuronal excitability, could surprisingly increase the reliability of excitatory synaptic transmission in the mammalian MNTB.





## Seznam použité literatury

- Adams JC, Mugnaini E (1990) Immunocytochemical evidence for inhibitory and disinhibitory circuits in the superior olive. *Hear Res* 49:281-298.
- Adelman JP, Maylie J, Sah P (2012) Small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels: form and function. *Annu Rev Physiol* 74:245-269.
- Ahmadi S, Kotalla C, Gühring H, Takeshima H, Pahl A, Zeilhofer HU (2001) Modulation of synaptic transmission by nociceptin/orphanin FQ and nocistatin in the spinal cord dorsal horn of mutant mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Mol Pharmacol* 59:612-618.
- Albrecht O, Dondzillo A, Mayer F, Thompson JA, Klug A (2014) Inhibitory projections from the ventral nucleus of the trapezoid body to the medial nucleus of the trapezoid body in the mouse. *Front Neural Circuits* 8:83.
- Alsbo CW, Kristiansen U, Møller F, Hansen SL, Johansen FF (2001) GABAA receptor subunit interactions important for benzodiazepine and zinc modulation: a patch-clamp and single cell RT-PCR study. *Eur J Neurosci* 13:1673-1682.
- Alvarez FJ, Dewey DE, Harrington DA, Fyffe RE (1997) Cell-type specific organization of glycine receptor clusters in the mammalian spinal cord. *J Comp Neurol* 379:150-170.
- Andermann F, Andermann E (1988) Startle disorders of man: hyperekplexia, jumping and startle epilepsy. *Brain Dev* 10:213-222.
- Araki T, Yamano M, Murakami T, Wanaka A, Betz H, Tohyama M (1988) Localization of glycine receptors in the rat central nervous system: an immunocytochemical analysis using monoclonal antibody. *Neuroscience* 25:613-624.
- Aroniadou-Anderjaska V, Zhou FM, Priest CA, Ennis M, Shipley MT (2000) Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *J Neurophysiol* 84:1194-1203.
- Awatramani GB, Turecek R, Trussell LO (2004) Inhibitory control at a synaptic relay. *J Neurosci* 24:2643-2647.
- Awatramani GB, Turecek R, Trussell LO (2005a) Staggered development of GABAergic and glycinergic transmission in the MNTB. *J Neurophysiol* 93:819-828.
- Awatramani GB, Price GD, Trussell LO (2005b) Modulation of transmitter release by presynaptic resting potential and background calcium levels. *Neuron* 48:109-121.
- Bae JY, Mah W, Rah JC, Park SK, Bae YC (2016) Expression of glycine receptor alpha 3 in the rat trigeminal neurons and central boutons in the brainstem. *Brain Struct Funct* 221:4601-4613.
- Bal T, McCormick DA (1993) Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. *J Physiol* 468:669-691.
- Balakrishnan V, Becker M, Löhrke S, Nothwang HG, Güresir E, Friauf E (2003) Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci* 23:4134-4145.
- Banks MI, Smith PH (1992) Intracellular recordings from neurobiotin-labeled cells in brain slices of the rat medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci* 12:2819-2837.
- Barnes-Davies M, Forsythe ID (1995) Pre- and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slices. *J Physiol* 488 ( Pt 2):387-406.
- Barnes-Davies M, Owens S, Forsythe ID (2001) Calcium channels triggering transmitter release in the rat medial superior olive. *Hear Res* 162:134-145.

- Barral J, Toro S, Galarraga E, Bargas J (2000) GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neurosci Lett* 283:33-36.
- Beato M (2008) The time course of transmitter at glycinergic synapses onto motoneurons. *J Neurosci* 28:7412-7425.
- Beato M, Sivilotti LG (2007) Single-channel properties of glycine receptors of juvenile rat spinal motoneurons in vitro. *J Physiol* 580:497-506.
- Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG (2002) Openings of the rat recombinant  $\alpha 1$  homomeric glycine receptor as a function of the number of agonist molecules bound. *J Gen Physiol* 119:443-466.
- Becker CM, Hoch W, Betz H (1988) Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO J* 7:3717-3726.
- Benton DC, Monaghan AS, Hosseini R, Bahia PK, Haylett DG, Moss GW (2003) Small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels formed by the expression of rat SK1 and SK2 genes in HEK 293 cells. *J Physiol* 553:13-19.
- Betz H, Laube B (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* 97:1600-1610.
- Biermann B, Ivankova-Susankova K, Bradaia A, Abdel Aziz S, Besseyrias V, Kapfhammer JP, Missler M, Gassmann M, Bettler B (2010) The Sushi domains of GABAB receptors function as axonal targeting signals. *J Neurosci* 30:1385-1394.
- Billinton A, Ige AO, Bolam JP, White JH, Marshall FH, Emson PC (2001) Advances in the molecular understanding of GABA(B) receptors. *Trends Neurosci* 24:277-282.
- Blankenship AG, Feller MB (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18-29.
- Blatz AL, Magleby KL (1986) Single apamin-blocked  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323:718-720.
- Bollmann JH, Helmchen F, Borst JG, Sakmann B (1998) Postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  influx mediated by three different pathways during synaptic transmission at a calyx-type synapse. *J Neurosci* 18:10409-10419.
- Bon C, Galvan M (1996) Electrophysiological actions of GABAB agonists and antagonists in rat dorso-lateral septal neurones in vitro. *Br J Pharmacol* 118:961-967.
- Bond CT, Maylie J, Adelman JP (1999) Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:370-378.
- Bond CT, Maylie J, Adelman JP (2005) SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr Opin Neurobiol* 15:305-311.
- Bond CT, Herson PS, Strassmaier T, Hammond R, Stackman R, Maylie J, Adelman JP (2004) Small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel knock-out mice reveal the identity of calcium-dependent afterhyperpolarization currents. *J Neurosci* 24:5301-5306.
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385:243-286.
- Bormann J, Rundström N, Betz H, Langosch D (1993) Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J* 12:3729-3737.
- Borst JG (2010) The low synaptic release probability in vivo. *Trends Neurosci* 33:259-266.
- Borst JG, Sakmann B (1996) Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature* 383:431-434.
- Borst JG, Soria van Hoeve J (2012) The calyx of Held synapse: from model synapse to auditory relay. *Annu Rev Physiol* 74:199-224.
- Boudreau JC, Tsuchitani C (1968) Binaural interaction in the cat superior olive S segment. *J Neurophysiol* 31:442-454.



- Bowden SE, Fletcher S, Loane DJ, Marrion NV (2001) Somatic colocalization of rat SK1 and D class (Ca<sub>v</sub>)1.2 L-type calcium channels in rat CA1 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 21:RC175.
- Bowery NG (1993) GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:109-147.
- Brugger F, Wicki U, Olpe HR, Froestl W, Mickel S (1993) The action of new potent GABAB receptor antagonists in the hemisected spinal cord preparation of the rat. *Eur J Pharmacol* 235:153-155.
- Burgos CF, Yévenes GE, Aguayo LG (2016) Structure and Pharmacologic Modulation of Inhibitory Glycine Receptors. *Mol Pharmacol* 90:318-325.
- Burzomato V, Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG (2004) Single-channel behavior of heteromeric  $\alpha 1\beta$  glycine receptors: an attempt to detect a conformational change before the channel opens. *J Neurosci* 24:10924-10940.
- Bussi res N, El Manira A (1999) GABA(B) receptor activation inhibits N- and P/Q-type calcium channels in cultured lamprey sensory neurons. *Brain Res* 847:175-185.
- Cai X, Liang CW, Muralidharan S, Kao JP, Tang CM, Thompson SM (2004) Unique roles of SK and Kv4.2 potassium channels in dendritic integration. *Neuron* 44:351-364.
- Caicedo A, Eybalin M (1999) Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. *Eur J Neurosci* 11:51-74.
- Chalifoux JR, Carter AG (2011) GABAB receptor modulation of synaptic function. *Curr Opin Neurobiol* 21:339-344.
- Chesnoy-Marchais D (1996) Potentiation of chloride responses to glycine by three 5-HT<sub>3</sub> antagonists in rat spinal neurones. *Br J Pharmacol* 118:2115-2125.
- Chesnoy-Marchais D (1999) Mode of action of ICS 205,930, a novel type of potentiator of responses to glycine in rat spinal neurones. *Br J Pharmacol* 126:801-809.
- Chuhma N, Ohmori H (1998) Postnatal development of phase-locked high-fidelity synaptic transmission in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Neurosci* 18:512-520.
- Cueni L, Canepari M, Luján R, Emmenegger Y, Watanabe M, Bond CT, Franken P, Adelman JP, L thi A (2008) T-type Ca<sup>2+</sup> channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites. *Nat Neurosci* 11:683-692.
- Davies CH, Collingridge GL (1996) Regulation of EPSPs by the synaptic activation of GABAB autoreceptors in rat hippocampus. *J Physiol* 496 ( Pt 2):451-470.
- Davies JS, Chung SK, Thomas RH, Robinson A, Hammond CL, Mullins JG, Carta E, Pearce BR, Harvey K, Harvey RJ, Rees MI (2010) The glycinergic system in human startle disease: a genetic screening approach. *Front Mol Neurosci* 3:8.
- del Pino I, Paarmann I, Karas M, Kilimann MW, Betz H (2011) The trafficking proteins Vacuolar Protein Sorting 35 and Neurobeachin interact with the glycine receptor  $\beta$ -subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 412:435-440.
- Deleuze C, Runquist M, Orcel H, Rabi  A, Dayanithi G, Alonso G, Hussy N (2005) Structural difference between heteromeric somatic and homomeric axonal glycine receptors in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Neuroscience* 135:475-483.
- Delpire E (2000) Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 15:309-312.
- Dondzillo A, Thompson JA, Klug A (2016) Recurrent Inhibition to the Medial Nucleus of the Trapezoid Body in the Mongolian Gerbil (*Meriones Unguiculatus*). *PLoS One* 11:e0160241.
- Durkin MM, Smith KE, Borden LA, Weinshank RL, Branchek TA, Gustafson EL (1995) Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 33:7-21.
- Edgerton JR, Reinhart PH (2003) Distinct contributions of small and large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol* 548:53-69.

- Ehrlich I, Lohrke S, Friauf E (1999) Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action in rat auditory neurones is due to age-dependent Cl<sup>-</sup> regulation. *J Physiol* 520 Pt 1:121-137.
- Emri Z, Turner JP, Crunelli V (1996) Tonic activation of presynaptic GABA(B) receptors on thalamic sensory afferents. *Neuroscience* 72:689-698.
- Estep CM, Galtieri DJ, Zampese E, Goldberg JA, Brichta L, Greengard P, Surmeier DJ (2016) Transient Activation of GABAB Receptors Suppresses SK Channel Currents in Substantia Nigra Pars Compacta Dopaminergic Neurons. *PLoS One* 11:e0169044.
- Faber DS, Korn H (1988) Synergism at central synapses due to lateral diffusion of transmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8708-8712.
- Faber ES, Sah P (2007) Functions of SK channels in central neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:1077-1083.
- Fatima-Shad K, Barry PH (1993) Anion permeation in GABA- and glycine-gated channels of mammalian cultured hippocampal neurons. *Proc Biol Sci* 253:69-75.
- Felmy F, Schneggenburger R (2004) Developmental expression of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins calretinin and parvalbumin at the calyx of Held of rats and mice. *Eur J Neurosci* 20:1473-1482.
- Ferragamo MJ, Golding NL, Oertel D (1998) Synaptic inputs to stellate cells in the ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 79:51-63.
- Fioravante D, Regehr WG (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21:269-274.
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR (1998) Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20:43-53.
- Ford MC, Grothe B, Klug A (2009) Fenestration of the calyx of Held occurs sequentially along the tonotopic axis, is influenced by afferent activity, and facilitates glutamate clearance. *J Comp Neurol* 514:92-106.
- Forsythe ID (1994) Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro. *J Physiol* 479 ( Pt 3):381-387.
- Francesconi A, Duvoisin RM (1998) Role of the second and third intracellular loops of metabotropic glutamate receptors in mediating dual signal transduction activation. *J Biol Chem* 273:5615-5624.
- Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H (1999) GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci* 11:761-768.
- Fritzius T, Turecek R, Seddik R, Kobayashi H, Tiao J, Rem PD, Metz M, Kralikova M, Bouvier M, Gassmann M, Bettler B (2017) KCTD Hetero-oligomers Confer Unique Kinetic Properties on Hippocampal GABAB Receptor-Induced K<sup>+</sup> Currents. *J Neurosci* 37:1162-1175.
- Fuentes-Santamaria V, Alvarado JC, Taylor AR, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2005) Quantitative changes in calretinin immunostaining in the cochlear nuclei after unilateral cochlear removal in young ferrets. *J Comp Neurol* 483:458-475.
- Futai K, Okada M, Matsuyama K, Takahashi T (2001) High-fidelity transmission acquired via a developmental decrease in NMDA receptor expression at an auditory synapse. *J Neurosci* 21:3342-3349.
- Gadbut AP, Cash SA, Noble JA, Radice TR, Weyhenmeyer JA (1991) The effect of Ca<sup>2+</sup> channel antagonists (cadmium, omega-conotoxin GIVA, and nitrendipine) on the release of angiotensin II from fetal rat brain in vitro. *Neurosci Lett* 123:91-94.
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265:11083-11090.

- Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prézeau L, Pin JP (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 20:2152-2159.
- Galvez T, Prezeau L, Milioti G, Franek M, Joly C, Froestl W, Bettler B, Bertrand HO, Blahos J, Pin JP (2000) Mapping the agonist-binding site of GABAB type 1 subunit sheds light on the activation process of GABAB receptors. *J Biol Chem* 275:41166-41174.
- Gao BX, Cheng G, Ziskind-Conhaim L (1998) Development of spontaneous synaptic transmission in the rat spinal cord. *J Neurophysiol* 79:2277-2287.
- Gassmann M, Bettler B (2012) Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nat Rev Neurosci* 13:380-394.
- Glavinović MI (1995) Decrease of quantal size and quantal content during tetanic stimulation detected by focal recording. *Neuroscience* 69:271-281.
- Gomez J, Joly C, Kuhn R, Knöpfel T, Bockaert J, Pin JP (1996) The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 271:2199-2205.
- Graham D, Pfeiffer F, Betz H (1983) Photoaffinity-labelling of the glycine receptor of rat spinal cord. *Eur J Biochem* 131:519-525.
- Green A, Walls S, Wise A, Green RH, Martin AK, Marshall FH (2000) Characterization of [(3)H]-CGP54626A binding to heterodimeric GABA(B) receptors stably expressed in mammalian cells. *Br J Pharmacol* 131:1766-1774.
- Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, Betz H (1990a) Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 4:963-970.
- Grenningloh G, Rienitz A, Schmitt B, Methfessel C, Zensen M, Beyreuther K, Gundelfinger ED, Betz H (1987) The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328:215-220.
- Grenningloh G, Schmieden V, Schofield PR, Seeburg PH, Siddique T, Mohandas TK, Becker CM, Betz H (1990b) Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *EMBO J* 9:771-776.
- Grothe B (2000) The evolution of temporal processing in the medial superior olive, an auditory brainstem structure. *Prog Neurobiol* 61:581-610.
- Grothe B (2003) New roles for synaptic inhibition in sound localization. *Nat Rev Neurosci* 4:540-550.
- Grothe B, Pecka M, McAlpine D (2010) Mechanisms of sound localization in mammals. *Physiol Rev* 90:983-1012.
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B (2005) The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45:727-739.
- Grunnet M, Jensen BS, Olesen SP, Klaerke DA (2001) Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch* 441:544-550.
- Grünert U, Wässle H (1993) Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 335:523-537.
- Grünwald S, Schupp BJ, Ikeda SR, Kuner R, Steigerwald F, Kornau HC, Köhr G (2002) Importance of the gamma-aminobutyric acid(B) receptor C-termini for G-protein coupling. *Mol Pharmacol* 61:1070-1080.
- Guettg N, Seddik R, Vigot R, Turecek R, Gassmann M, Vogt KE, Bräuner-Osborne H, Shigemoto R, Kretz O, Frotscher M, Kulik A, Bettler B (2009) The GABAB1a isoform mediates heterosynaptic depression at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 29:1414-1423.

- Guinan JJ, Norris BE, Guinan SS (1972) Single auditory units in the superior olive complex II: tonotopic organization and locations of unit categories. *Int J Neurosci* 4:147–166.
- Hamann M, Billups B, Forsythe ID (2003) Non-calyceal excitatory inputs mediate low fidelity synaptic transmission in rat auditory brainstem slices. *Eur J Neurosci* 18:2899-2902.
- Harty TP, Manis PB (1996) Glycine-evoked currents in acutely dissociated neurons of the guinea pig ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 75:2300-2311.
- Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U (2004) GlyR  $\alpha 3$ : an essential target for spinal PGE<sub>2</sub>-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884-887.
- Hassfurth B, Grothe B, Koch U (2010) The mammalian interaural time difference detection circuit is differentially controlled by GABAB receptors during development. *J Neurosci* 30:9715-9727.
- Havey DC, Caspary DM (1980) A simple technique for constructing 'piggy-back' multibarrel microelectrodes. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 48:249-251.
- Havlickova M, Prezeau L, Duthey B, Bettler B, Pin JP, Blahos J (2002) The intracellular loops of the GB2 subunit are crucial for G-protein coupling of the heteromeric gamma-aminobutyrate B receptor. *Mol Pharmacol* 62:343-350.
- Havlickova M, Blahos J, Brabet I, Liu J, Hruskova B, Prézeau L, Pin JP (2003) The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptors recognizes C termini of G-protein  $\alpha$ -subunits. *J Biol Chem* 278:35063-35070.
- Hawrot E, Xiao Y, Shi QL, Norman D, Kirkitadze M, Barlow PN (1998) Demonstration of a tandem pair of complement protein modules in GABA(B) receptor 1a. *FEBS Lett* 432:103-108.
- Held H (1893) Die zentrale Gehörleitung. *Arch Anat Physiol Anat Abteil* 17:201-248.
- Hill DR, Bowery NG (1981) 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290:149-152.
- Hirschberg B, Maylie J, Adelman JP, Marrion NV (1998) Gating of recombinant small-conductance Ca-activated K<sup>+</sup> channels by calcium. *J Gen Physiol* 111:565-581.
- Hoffpauir BK, Grimes JL, Mathers PH, Spirou GA (2006) Synaptogenesis of the calyx of Held: rapid onset of function and one-to-one morphological innervation. *J Neurosci* 26:5511-5523.
- Hoffpauir BK, Kolson DR, Mathers PH, Spirou GA (2010) Maturation of synaptic partners: functional phenotype and synaptic organization tuned in synchrony. *J Physiol* 588:4365-4385.
- Hongyuan B, Xin D, Jingwen Z, Li G, Yajuan N (2016) Apamin-Sensitive Small Conductance Calcium-Activated Potassium Channels were Negatively Regulated by Captopril in Volume-Overload Heart Failure Rats. *J Membr Biol* 249:429-436.
- Hori T, Takahashi T (2009) Mechanisms underlying short-term modulation of transmitter release by presynaptic depolarization. *J Physiol* 587:2987-3000.
- Hruskova B, Trojanova J, Kulik A, Kralikova M, Pysanenko K, Bures Z, Syka J, Trussell LO, Turecek R (2012) Differential distribution of glycine receptor subtypes at the rat calyx of Held synapse. *J Neurosci* 32:17012-17024.
- Höfner G, Wanner KT (2004) Evaluation of GABA uptake in subcellular fractions of bovine frontal cortex and brainstem. *Neurosci Lett* 364:53-57.
- Isaacson JS (1998) GABAB receptor-mediated modulation of presynaptic currents and excitatory transmission at a fast central synapse. *J Neurophysiol* 80:1571-1576.
- Ishii TM, Maylie J, Adelman JP (1997) Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J Biol Chem* 272:23195-23200.
- Iwasaki S, Takahashi T (1998) Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol* 509 ( Pt 2):419-423.

- Jeong HJ, Jang IS, Moorhouse AJ, Akaike N (2003) Activation of presynaptic glycine receptors facilitates glycine release from presynaptic terminals synapsing onto rat spinal sacral dorsal commissural nucleus neurons. *J Physiol* 550:373-383.
- Jercog PE, Svirskis G, Kotak VC, Sanes DH, Rinzel J (2010) Asymmetric excitatory synaptic dynamics underlie interaural time difference processing in the auditory system. *PLoS Biol* 8:e1000406.
- Jiang ZG, Shi XR, Guan BC, Zhao H, Yang YQ (2007) Dihydropyridines inhibit acetylcholine-induced hyperpolarization in cochlear artery via blockade of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 320:544-551.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396:674-679.
- Kajikawa Y, Saitoh N, Takahashi T (2001) GTP-binding protein beta gamma subunits mediate presynaptic calcium current inhibition by GABA(B) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8054-8058.
- Kandler K, Friauf E (1995) Development of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in the auditory brainstem of perinatal rats. *J Neurosci* 15:6890-6904.
- Kandler K, Gillespie DC (2005) Developmental refinement of inhibitory sound-localization circuits. *Trends Neurosci* 28:290-296.
- Karschin C, Dissmann E, Stühmer W, Karschin A (1996) IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci* 16:3559-3570.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-246.
- Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, Bischoff S, Bittiger H, Heid J, Froestl W, Leonhard S, Pfaff T, Karschin A, Bettler B (1998a) Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14991-14996.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B (1998b) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396:683-687.
- Kawa K (2003) Glycine facilitates transmitter release at developing synapses: a patch clamp study from Purkinje neurons of the newborn rat. *Brain Res Dev Brain Res* 144:57-71.
- Keen JE, Khawaled R, Farrens DL, Neelands T, Rivard A, Bond CT, Janowsky A, Fakler B, Adelman JP, Maylie J (1999) Domains responsible for constitutive and Ca(2+)-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *J Neurosci* 19:8830-8838.
- Kerr DI, Ong J, Prager RH, Gynther BD, Curtis DR (1987) Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res* 405:150-154.
- Kirsch J, Betz H (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392:717-720.
- Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem* 266:22242-22245.
- Kneussel M, Betz H (2000) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 23:429-435.
- Kniazeff J, Galvez T, Labesse G, Pin JP (2002) No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J Neurosci* 22:7352-7361.

- Kontro P, Oja SS (1990) Interactions of taurine with GABAB binding sites in mouse brain. *Neuropharmacology* 29:243-247.
- Kopp-Scheinpflug C, Steinert JR, Forsythe ID (2011) Modulation and control of synaptic transmission across the MNTB. *Hear Res* 279:22-31.
- Kopp-Scheinpflug C, Lippe WR, Dörrscheidt GJ, Rübsamen R (2003) The medial nucleus of the trapezoid body in the gerbil is more than a relay: comparison of pre- and postsynaptic activity. *J Assoc Res Otolaryngol* 4:1-23.
- Kopp-Scheinpflug C, Tolnai S, Malmierca MS, Rübsamen R (2008) The medial nucleus of the trapezoid body: comparative physiology. *Neuroscience* 154:160-170.
- Korada S, Schwartz IR (1999) Development of GABA, glycine, and their receptors in the auditory brainstem of gerbil: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 409:664-681.
- Kotak VC, Korada S, Schwartz IR, Sanes DH (1998) A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci* 18:4646-4655.
- Kubota H, Alle H, Betz H, Geiger JR (2010) Presynaptic glycine receptors on hippocampal mossy fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 393:587-591.
- Kuhse J, Schmieden V, Betz H (1990) Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 265:22317-22320.
- Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H (1991) Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett* 283:73-77.
- Kulik A, Nakadate K, Nyíri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R (2002) Distinct localization of GABA(B) receptors relative to synaptic sites in the rat cerebellum and ventrobasal thalamus. *Eur J Neurosci* 15:291-307.
- Kulik A, Vida I, Luján R, Haas CA, López-Bendito G, Shigemoto R, Frotscher M (2003) Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. *J Neurosci* 23:11026-11035.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407:971-977.
- Kushmerick C, Price GD, Taschenberger H, Puente N, Renden R, Wadiche JI, Duvoisin RM, Grandes P, von Gersdorff H (2004) Retroinhibition of presynaptic Ca<sup>2+</sup> currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *J Neurosci* 24:5955-5965.
- Kuwabara N, Zook JM (1991) Classification of the principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body. *J Comp Neurol* 314:707-720.
- Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273:1709-1714.
- Ladera C, del Carmen Godino M, José Cabañero M, Torres M, Watanabe M, Luján R, Sánchez-Prieto J (2008) Pre-synaptic GABA receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 107:1506-1517.
- Langosch D, Becker CM, Betz H (1990) The inhibitory glycine receptor: a ligand-gated chloride channel of the central nervous system. *Eur J Biochem* 194:1-8.
- Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H (2002) Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci* 23:519-527.
- Lawrence JJ, Trussell LO (2000) Long-term specification of AMPA receptor properties after synapse formation. *J Neurosci* 20:4864-4870.
- Lay DM (1972) The anatomy, physiology, functional significance and evolution of specialized hearing organs of gerbilline rodents. *J Morphol* 138:41-120.

- Leao RN, Oleskevich S, Sun H, Bautista M, Fyffe RE, Walmsley B (2004) Differences in glycinergic mIPSCs in the auditory brain stem of normal and congenitally deaf neonatal mice. *J Neurophysiol* 91:1006-1012.
- Lee EA, Cho JH, Choi IS, Nakamura M, Park HM, Lee JJ, Lee MG, Choi BJ, Jang IS (2009) Presynaptic glycine receptors facilitate spontaneous glutamate release onto hilar neurons in the rat hippocampus. *J Neurochem* 109:275-286.
- Legendre P (1997) Pharmacological evidence for two types of postsynaptic glycinergic receptors on the Mauthner cell of 52-h-old zebrafish larvae. *J Neurophysiol* 77:2400-2415.
- Legendre P (1998) A reluctant gating mode of glycine receptor channels determines the time course of inhibitory miniature synaptic events in zebrafish hindbrain neurons. *J Neurosci* 18:2856-2870.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58:760-793.
- Legendre P, Förster B, Jüttner R, Meier JC (2009) Glycine Receptors Caught between Genome and Proteome - Functional Implications of RNA Editing and Splicing. *Front Mol Neurosci* 2:23.
- Legendre P, Muller E, Badiu CI, Meier J, Vannier C, Triller A (2002) Desensitization of homomeric  $\alpha 1$  glycine receptor increases with receptor density. *Mol Pharmacol* 62:817-827.
- Lewis KS, Mueller WM (1993) Intrathecal baclofen for severe spasticity secondary to spinal cord injury. *Ann Pharmacother* 27:767-774.
- Leão RM, Von Gersdorff H (2002) Noradrenaline increases high-frequency firing at the calyx of Held synapse during development by inhibiting glutamate release. *J Neurophysiol* 87:2297-2306.
- Lim R, Alvarez FJ, Walmsley B (2000) GABA mediates presynaptic inhibition at glycinergic synapses in a rat auditory brainstem nucleus. *J Physiol* 525 Pt 2:447-459.
- Lim R, Oleskevich S, Few AP, Leao RN, Walmsley B (2003) Glycinergic mIPSCs in mouse and rat brainstem auditory nuclei: modulation by ruthenium red and the role of calcium stores. *J Physiol* 546:691-699.
- Lippe WR (1994) Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J Neurosci* 14:1486-1495.
- Liu J, Maurel D, Etzol S, Brabet I, Ansanay H, Pin JP, Rondard P (2004) Molecular determinants involved in the allosteric control of agonist affinity in the GABAB receptor by the GABAB2 subunit. *J Biol Chem* 279:15824-15830.
- Liégeois JF, Mercier F, Graulich A, Graulich-Lorge F, Scuvée-Moreau J, Seutin V (2003) Modulation of small conductance calcium-activated potassium (SK) channels: a new challenge in medicinal chemistry. *Curr Med Chem* 10:625-647.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology* NY: W. H. Freeman and Company.
- Lohmann C, Friauf E (1996) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J Comp Neurol* 367:90-109.
- Lortelje JA, Rusu SI, Kushmerick C, Borst JG (2009) Reliability and precision of the mouse calyx of Held synapse. *J Neurosci* 29:13770-13784.
- Lu T, Rubio ME, Trussell LO (2008) Glycinergic transmission shaped by the corelease of GABA in a mammalian auditory synapse. *Neuron* 57:524-535.
- Lu Y, Harris JA, Rubel EW (2007) Development of spontaneous miniature EPSCs in mouse AVCN neurons during a critical period of afferent-dependent neuron survival. *J Neurophysiol* 97:635-646.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84:1051-1095.

- Lynch JW (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* 56:303-309.
- Lynch JW, Rajendra S, Barry PH, Schofield PR (1995) Mutations affecting the glycine receptor agonist transduction mechanism convert the competitive antagonist, picrotoxin, into an allosteric potentiator. *J Biol Chem* 270:13799-13806.
- Lynch JW, Zhang Y, Talwar S, Estrada-Mondragon A (2017) Glycine Receptor Drug Discovery. *Adv Pharmacol* 79:225-253.
- Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19:687-695.
- Maas C, Tagnaouti N, Loeblich S, Behrend B, Lappe-Siefke C, Kneussel M (2006) Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol* 172:441-451.
- Magnusson AK, Park TJ, Pecka M, Grothe B, Koch U (2008) Retrograde GABA signaling adjusts sound localization by balancing excitation and inhibition in the brainstem. *Neuron* 59:125-137.
- Maingret F, Coste B, Hao J, Giamarchi A, Allen D, Crest M, Litchfield DW, Adelman JP, Delmas P (2008) Neurotransmitter modulation of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by regulation of Ca<sup>2+</sup> gating. *Neuron* 59:439-449.
- Maksay G, Laube B, Schemm R, Grudzinska J, Drwal M, Betz H (2009) Different binding modes of tropeines mediating inhibition and potentiation of  $\alpha 1$  glycine receptors. *J Neurochem* 109:1725-1732.
- Malherbe P, Masciadri R, Norcross RD, Knoflach F, Kratzeisen C, Zenner MT, Kolb Y, Marcuz A, Huwyler J, Nakagawa T, Porter RH, Thomas AW, Wettstein JG, Sleight AJ, Spooren W, Prinssen EP (2008) Characterization of (R,S)-5,7-di-tert-butyl-3-hydroxy-3-trifluoromethyl-3H-benzofuran-2-one as a positive allosteric modulator of GABAB receptors. *Br J Pharmacol* 154:797-811.
- Malitschek B, Rüegg D, Heid J, Kaupmann K, Bittiger H, Fröstl W, Bettler B, Kuhn R (1998) Developmental changes of agonist affinity at GABABR1 receptor variants in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 12:56-64.
- Malosio ML, Marqu  ze-Pouey B, Kuhse J, Betz H (1991a) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 10:2401-2409.
- Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H (1991b) Alternative splicing generates two variants of the  $\alpha 1$  subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 266:2048-2053.
- Mangin JM, Baloul M, Prado De Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P (2003) Kinetic properties of the  $\alpha 2$  homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *J Physiol* 553:369-386.
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.
- Marrion NV, Tavalin SJ (1998) Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by co-localized Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurons. *Nature* 395:900-905.
- Martinez-Galan JR, Caminos E, Vale C, Juiz JM (2007) Auditory nerve input is not an absolute requirement for the expression, distribution and calcium permeability of AMPA receptors in the adult rat ventral cochlear nucleus. *Brain Res* 1138:21-29.
- Marty A, Neher E (1985) Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 367:117-141.
- Matzenbach B, Maulet Y, Sefton L, Courtier B, Avner P, Gu  net JL, Betz H (1994) Structural analysis of mouse glycine receptor  $\alpha$  subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant. *J Biol Chem* 269:2607-2612.



- Maylie J, Bond CT, Herson PS, Lee WS, Adelman JP (2004) Small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels and calmodulin. *J Physiol* 554:255-261.
- Mazo C, Lepousez G, Nissant A, Valley MT, Lledo PM (2016) GABAB Receptors Tune Cortical Feedback to the Olfactory Bulb. *J Neurosci* 36:8289-8304.
- McCarthy RT, TanPiengco PE (1992) Multiple types of high-threshold calcium channels in rabbit sensory neurons: high-affinity block of neuronal L-type by nimodipine. *J Neurosci* 12:2225-2234.
- Mehrke G, Zong XG, Flockerzi V, Hofmann F (1994) The  $\text{Ca}^{++}$ -channel blocker Ro 40-5967 blocks differently T-type and L-type  $\text{Ca}^{++}$  channels. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1483-1488.
- Meyer AC, Neher E, Schneggenburger R (2001) Estimation of quantal size and number of functional active zones at the calyx of Held synapse by nonstationary EPSC variance analysis. *J Neurosci* 21:7889-7900.
- Middlebrooks JC (2015) Sound localization. *Handb Clin Neurol* 129:99-116.
- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W (1995) A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 46:423-462.
- Mohammadi B, Krampfl K, Cetinkaya C, Moschref H, Grosskreutz J, Dengler R, Bufler J (2003) Kinetic analysis of recombinant mammalian  $\alpha(1)$  and  $\alpha(1)\beta$  glycine receptor channels. *Eur Biophys J* 32:529-536.
- Monaghan AS, Benton DC, Bahia PK, Hosseini R, Shah YA, Haylett DG, Moss GW (2004) The SK3 subunit of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels interacts with both SK1 and SK2 subunits in a heterologous expression system. *J Biol Chem* 279:1003-1009.
- Moore JK, Moore RY (1987) Glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in brainstem auditory nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 260:157-174.
- Morest DK (1968a) The growth of synaptic endings in the mammalian brain: a study of the calyces of the trapezoid body. *Z Anat Entwicklungsgesch* 127:201-220.
- Morest DK (1968b) The collateral system of the medial nucleus of the trapezoid body of the cat, its neuronal architecture and relation to the olivo-cochlear bundle. *Brain Res* 9:288-311.
- Mukherjee RS, McBride EW, Beinborn M, Dunlap K, Kopin AS (2006) Point mutations in either subunit of the GABAB receptor confer constitutive activity to the heterodimer. *Mol Pharmacol* 70:1406-1413.
- Muller E, Le-Corrone H, Legendre P (2008) Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labor? *Front Mol Neurosci* 1:3.
- Mørkve SH, Hartveit E (2009) Properties of glycine receptors underlying synaptic currents in presynaptic axon terminals of rod bipolar cells in the rat retina. *J Physiol* 587:3813-3830.
- Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A, Ishibashi H (2004) Developmental switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals. *Nat Neurosci* 7:17-23.
- Nikolic Z, Laube B, Weber RG, Lichter P, Kioschis P, Poustka A, Mülhardt C, Becker CM (1998) The human glycine receptor subunit  $\alpha 3$ . *Gla3* gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. *J Biol Chem* 273:19708-19714.
- Noble K, Floyd R, Shmygol A, Mobasheri A, Wray S (2010) Distribution, expression and functional effects of small conductance  $\text{Ca}$ -activated potassium (SK) channels in rat myometrium. *Cell Calcium* 47:47-54.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-727.

- Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prezeau L, Blahos J, Pin J, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B (2001) C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci* 21:1189-1202.
- Park YB (1994) Ion selectivity and gating of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 481 ( Pt 3):555-570.
- Pecka M, Brand A, Behrend O, Grothe B (2008) Interaural time difference processing in the mammalian medial superior olive: the role of glycinergic inhibition. *J Neurosci* 28:6914-6925.
- Pedarzani P, Mosbacher J, Rivard A, Cingolani LA, Oliver D, Stocker M, Adelman JP, Fakler B (2001) Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *J Biol Chem* 276:9762-9769.
- Pedarzani P, McCutcheon JE, Rogge G, Jensen BS, Christophersen P, Hougaard C, Strøbaek D, Stocker M (2005) Specific enhancement of SK channel activity selectively potentiates the afterhyperpolarizing current  $I(\text{AHP})$  and modulates the firing properties of hippocampal pyramidal neurons. *J Biol Chem* 280:41404-41411.
- Pfeiffer F, Betz H (1981) Solubilization of the glycine receptor from rat spinal cord. *Brain Res* 226:273-279.
- Pfeiffer F, Simler R, Grenningloh G, Betz H (1984) Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7224-7227.
- Pickles JO (2015) Auditory pathways: anatomy and physiology. *Handb Clin Neurol* 129:3-25.
- Potashner SJ, Suneja SK, Benson CG (2000) Altered glycinergic synaptic activities in guinea pig brain stem auditory nuclei after unilateral cochlear ablation. *Hear Res* 147:125-136.
- Pourcho RG (1996) Neurotransmitters in the retina. *Curr Eye Res* 15:797-803.
- Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H (1992) The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J* 11:4305-4311.
- Price GD, Trussell LO (2006) Estimate of the chloride concentration in a central glutamatergic terminal: a gramicidin perforated-patch study on the calyx of Held. *J Neurosci* 26:11432-11436.
- Prior P, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8:1161-1170.
- Probst A, Cortés R, Palacios JM (1986) The distribution of glycine receptors in the human brain. A light microscopic autoradiographic study using  $[3\text{H}]$ strychnine. *Neuroscience* 17:11-35.
- Purves D, Augustine G, Ehlers M, Einstein G, Fitzpatrick D (2001) *Neuroscience*, 2nd Edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 23 Plumtree Road, Sunderland, MA 01375 U.S.A.
- Rajendra S, Schofield PR (1995) Molecular mechanisms of inherited startle syndromes. *Trends Neurosci* 18:80-82.
- Rees MI, Lewis TM, Kwok JB, Mortier GR, Govaert P, Snell RG, Schofield PR, Owen MJ (2002) Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Hum Mol Genet* 11:853-860.
- Rees MI, Harvey K, Ward H, White JH, Evans L, Duguid IC, Hsu CC, Coleman SL, Miller J, Baer K, Waldvogel HJ, Gibbon F, Smart TG, Owen MJ, Harvey RJ, Snell RG (2003) Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J Biol Chem* 278:24688-24696.
- Regehr WG (2012) Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005702.

- Renden R, Taschenberger H, Puente N, Rusakov DA, Duvoisin R, Wang LY, Lehre KP, von Gersdorff H (2005) Glutamate transporter studies reveal the pruning of metabotropic glutamate receptors and absence of AMPA receptor desensitization at mature calyx of Held synapses. *J Neurosci* 25:8482-8497.
- Reyes BAS, Carvalho AF, Szot P, Kalamarides DJ, Wang Q, Kirby LG, Van Bockstaele EJ (2017) Cortical adrenoceptor expression, function and adaptation under conditions of cannabinoid receptor deletion. *Exp Neurol* 292:179-192.
- Rigo JM, Badiu CI, Legendre P (2003) Heterogeneity of postsynaptic receptor occupancy fluctuations among glycinergic inhibitory synapses in the zebrafish hindbrain. *J Physiol* 553:819-832.
- Robinson HP, Kawai N (1993) Injection of digitally synthesized synaptic conductance transients to measure the integrative properties of neurons. *J Neurosci Methods* 49:157-165.
- Rodríguez-Contreras A, van Hoeve JS, Habets RL, Locher H, Borst JG (2008) Dynamic development of the calyx of Held synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5603-5608.
- Rohmann KN, Wersinger E, Braude JP, Pyott SJ, Fuchs PA (2015) Activation of BK and SK channels by efferent synapses on outer hair cells in high-frequency regions of the rodent cochlea. *J Neurosci* 35:1821-1830.
- Roth FC, Draguhn A (2012) GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy. *Neural Plast* 2012:805830.
- Rundström N, Schmieden V, Betz H, Bormann J, Langosch D (1994) Cyanotriphenylborate: subtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8950-8954.
- Rusu SI, Borst JG (2011) Developmental changes in intrinsic excitability of principal neurons in the rat medial nucleus of the trapezoid body. *Dev Neurobiol* 71:284-295.
- Sah P, Faber ES (2002) Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol* 66:345-353.
- Sailer CA, Kaufmann WA, Marksteiner J, Knaus HG (2004) Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 26:458-469.
- Sailer CA, Hu H, Kaufmann WA, Trieb M, Schwarzer C, Storm JF, Knaus HG (2002) Regional differences in distribution and functional expression of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in rat brain. *J Neurosci* 22:9698-9707.
- Sakaba T, Neher E (2001) Quantitative relationship between transmitter release and calcium current at the calyx of held synapse. *J Neurosci* 21:462-476.
- Sakaba T, Neher E (2003) Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* 424:775-778.
- Saransaari P, Oja SS (2006) Characteristics of taurine release in slices from adult and developing mouse brain stem. *Amino Acids* 31:35-43.
- Sato K, Park NG, Kohno T, Maeda T, Kim JI, Kato R, Takahashi M (1993) Role of basic residues for the binding of omega-conotoxin GVIA to N-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 194:1292-1296.
- Schneggenburger R, Meyer AC, Neher E (1999) Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* 23:399-409.
- Schumacher MA, Rivard AF, Bächinger HP, Adelman JP (2001) Structure of the gating domain of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel complexed with  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin. *Nature* 410:1120-1124.
- Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, Trojanova J, Rohde V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* 465:231-235.

- Seabrook GR, Howson W, Lacey MG (1990) Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABAB receptors on neurones in rat brain slices. *Br J Pharmacol* 101:949-957.
- Seidel KN, Derst C, Salzmann M, Hölte M, Priller J, Markgraf R, Heinemann SH, Heilmann H, Skatchkov SN, Eaton MJ, Veh RW, Prüss H (2011) Expression of the voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent BK potassium channel subunits  $\text{BK}\beta 1$  and  $\text{BK}\beta 4$  in rodent astrocytes. *Glia* 59:893-902.
- Shaban H, Humeau Y, Herry C, Cassasus G, Shigemoto R, Cioocchi S, Barbieri S, van der Putten H, Kaupmann K, Bettler B, Lüthi A (2006) Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 9:1028-1035.
- Sharp AA, O'Neil MB, Abbott LF, Marder E (1993) Dynamic clamp: computer-generated conductances in real neurons. *J Neurophysiol* 69:992-995.
- Shenton F, Bewick GS, Banks RW (2014) A study of the expression of small conductance calcium-activated potassium channels (SK1-3) in sensory endings of muscle spindles and lanceolate endings of hair follicles in the rat. *PLoS One* 9:e107073.
- Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Hahn AF, O'Connell P, Wasmuth JJ (1993) Mutations in the  $\alpha 1$  subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nat Genet* 5:351-358.
- Singer JH, Berger AJ (2000) Development of inhibitory synaptic transmission to motoneurons. *Brain Res Bull* 53:553-560.
- Singer JH, Talley EM, Bayliss DA, Berger AJ (1998) Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 80:2608-2620.
- Smith AJ, Owens S, Forsythe ID (2000) Characterisation of inhibitory and excitatory postsynaptic currents of the rat medial superior olive. *J Physiol* 529 Pt 3:681-698.
- Smith PH, Joris PX, Yin TC (1998) Anatomy and physiology of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) of the cat. *J Neurophysiol* 79:3127-3142.
- Smith PH, Joris PX, Carney LH, Yin TC (1991) Projections of physiologically characterized globular bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 304:387-407.
- Soh H, Park CS (2001) Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels rendered by intracellular divalent cation blockade. *Biophys J* 80:2207-2215.
- Sommer I, Lingenhöhl K, Friauf E (1993) Principal cells of the rat medial nucleus of the trapezoid body: an intracellular in vivo study of their physiology and morphology. *Exp Brain Res* 95:223-239.
- Spirou GA, Brownell WE, Zidanic M (1990) Recordings from cat trapezoid body and HRP labeling of globular bushy cell axons. *J Neurophysiol* 63:1169-1190.
- Stackman RW, Hammond RS, Linardatos E, Gerlach A, Maylie J, Adelman JP, Tzounopoulos T (2002) Small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J Neurosci* 22:10163-10171.
- Stampacchia G, Gerini A, Mazzoleni S (2016) Effects of severe spasticity treatment with intrathecal Baclofen in multiple sclerosis patients: Long term follow-up. *NeuroRehabilitation* 38:385-393.
- Stein V, Nicoll RA (2003) GABA generates excitement. *Neuron* 37:375-378.
- Stephan J, Friauf E (2014) Functional analysis of the inhibitory neurotransmitter transporters GlyT1, GAT-1, and GAT-3 in astrocytes of the lateral superior olive. *Glia* 62:1992-2003.
- Stocker M (2004)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* 5:758-770.

- Stocker M, Pedarzani P (2000) Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 15:476-493.
- Stocker M, Krause M, Pedarzani P (1999) An apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4662-4667.
- Stocker M, Hirzel K, D'hoedt D, Pedarzani P (2004) Matching molecules to function: neuronal Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and afterhyperpolarizations. *Toxicon* 43:933-949.
- Strassmaier T, Bond CT, Sailer CA, Knaus HG, Maylie J, Adelman JP (2005) A novel isoform of SK2 assembles with other SK subunits in mouse brain. *J Biol Chem* 280:21231-21236.
- Strøbaek D, Teuber L, Jørgensen TD, Ahring PK, Kjaer K, Hansen RS, Olesen SP, Christophersen P, Skaaning-Jensen B (2004) Activation of human IK and SK Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime). *Biochim Biophys Acta* 1665:1-5.
- Sun JY, Wu LG (2001) Fast kinetics of exocytosis revealed by simultaneous measurements of presynaptic capacitance and postsynaptic currents at a central synapse. *Neuron* 30:171-182.
- Suneja SK, Benson CG, Potashner SJ (1998a) Glycine receptors in adult guinea pig brain stem auditory nuclei: regulation after unilateral cochlear ablation. *Exp Neurol* 154:473-488.
- Suneja SK, Potashner SJ, Benson CG (1998b) Plastic changes in glycine and GABA release and uptake in adult brain stem auditory nuclei after unilateral middle ear ossicle removal and cochlear ablation. *Exp Neurol* 151:273-288.
- Supplisson S, Chesnoy-Marchais D (2000) Glycine receptor beta subunits play a critical role in potentiation of glycine responses by ICS-205,930. *Mol Pharmacol* 58:763-770.
- Suwa H, Saint-Amant L, Triller A, Drapeau P, Legendre P (2001) High-affinity zinc potentiation of inhibitory postsynaptic glycinergic currents in the zebrafish hindbrain. *J Neurophysiol* 85:912-925.
- Swearengen JR, Kittell CL, Davis JA, Raslear TG, Beblo DA, Colleton CA (1993) A surgical technique for bilateral cochleotomy in the Long-Evans rat. *J Invest Surg* 6:431-437.
- Swensen AM, Bean BP (2003) Ionic mechanisms of burst firing in dissociated Purkinje neurons. *J Neurosci* 23:9650-9663.
- Sätzler K, Söhl LF, Bollmann JH, Borst JG, Frotscher M, Sakmann B, Lübke JH (2002) Three-dimensional reconstruction of a calyx of Held and its postsynaptic principal neuron in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci* 22:10567-10579.
- Takahashi T (2005) Postsynaptic receptor mechanisms underlying developmental speeding of synaptic transmission. *Neurosci Res* 53:229-240.
- Takahashi T, Kajikawa Y, Tsujimoto T (1998) G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J Neurosci* 18:3138-3146.
- Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H (1992) Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron* 9:1155-1161.
- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* 274:594-597.
- Tan ML, Borst JG (2007) Comparison of responses of neurons in the mouse inferior colliculus to current injections, tones of different durations, and sinusoidal amplitude-modulated tones. *J Neurophysiol* 98:454-466.
- Taschenberger H, von Gersdorff H (2000) Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 20:9162-9173.

- Taschenberger H, Leão RM, Rowland KC, Spirou GA, von Gersdorff H (2002) Optimizing synaptic architecture and efficiency for high-frequency transmission. *Neuron* 36:1127-1143.
- Tatebayashi H, Ogata N (1992) GABAB-mediated modulation of the voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Gen Pharmacol* 23:309-316.
- Terstappen GC, Pula G, Carignani C, Chen MX, Roncarati R (2001) Pharmacological characterisation of the human small conductance calcium-activated potassium channel hSK3 reveals sensitivity to tricyclic antidepressants and antipsychotic phenothiazines. *Neuropharmacology* 40:772-783.
- Thomas CG, Miller AJ, Westbrook GL (2006) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 95:1727-1734.
- Tritsch NX, Rodríguez-Contreras A, Crins TT, Wang HC, Borst JG, Bergles DE (2010) Calcium action potentials in hair cells pattern auditory neuron activity before hearing onset. *Nat Neurosci* 13:1050-1052.
- Trojanova J (2014) Immunohistochemical analysis of the inhibitory glycine and GABAB receptors in the MNTB. In: Department of Auditory Neuroscience, IEM CAS, p 138. Prague: Charles University.
- Trojanova J, Kulik A, Janacek J, Kralikova M, Syka J, Turecek R (2014) Distribution of glycine receptors on the surface of the mature calyx of Held nerve terminal. *Front Neural Circuits* 8:120.
- Tsien RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19:2396-2404.
- Tsuchitani C (1994) The brain stem evoked response and medial nucleus of the trapezoid body. *Otolaryngol Head Neck Surg* 110:84-92.
- Tsuchitani C (1997) Input from the medial nucleus of trapezoid body to an interaural level detector. *Hear Res* 105:211-224.
- Tsuji J, Liberman MC (1997) Intracellular labeling of auditory nerve fibers in guinea pig: central and peripheral projections. *J Comp Neurol* 381:188-202.
- Turecek R, Trussell LO (2001) Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 411:587-590.
- Turecek R, Trussell LO (2002) Reciprocal developmental regulation of presynaptic ionotropic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13884-13889.
- Turecek R, Schwenk J, Fritzius T, Ivankova K, Zolles G, Adelfinger L, Jacquier V, Besseyrias V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B (2014) Auxiliary GABAB receptor subunits uncouple G protein  $\beta\gamma$  subunits from effector channels to induce desensitization. *Neuron* 82:1032-1044.
- Tzounopoulos T, Stackman R (2003) Enhancing synaptic plasticity and memory: a role for small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *Neuroscientist* 9:434-439.
- Ulrich D, Besseyrias V, Bettler B (2007) Functional mapping of GABA(B)-receptor subtypes in the thalamus. *J Neurophysiol* 98:3791-3795.
- Urwyler S, Mosbacher J, Lingenhoehl K, Heid J, Hofstetter K, Froestl W, Bettler B, Kaupmann K (2001) Positive allosteric modulation of native and recombinant gamma-aminobutyric acid(B) receptors by 2,6-Di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501. *Mol Pharmacol* 60:963-971.
- van den Pol AN, Gorcs T (1988) Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. *J Neurosci* 8:472-492.
- Vigot R, Barbieri S, Bräuner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang YP, Luján R, Jacobson LH, Biermann B, Fritschy JM, Vacher CM, Müller M, Sansig G, Guetg N, Cryan JF, Kaupmann K, Gassmann M, Oertner TG, Bettler B (2006) Differential

- compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* 50:589-601.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Wang DS, Mangin JM, Moonen G, Rigo JM, Legendre P (2006) Mechanisms for picrotoxin block of  $\alpha 2$  homomeric glycine receptors. *J Biol Chem* 281:3841-3855.
- Wang DS, Buckinx R, Lecorrone H, Mangin JM, Rigo JM, Legendre P (2007) Mechanisms for picrotoxin and picrotin blocks of  $\alpha 2$  homomeric glycine receptors. *J Biol Chem* 282:16016-16035.
- Wang LY, Augustine GJ (2014) Presynaptic nanodomains: a tale of two synapses. *Front Cell Neurosci* 8:455.
- Wang T, Rusu SI, Hruskova B, Turecek R, Borst JG (2013) Modulation of synaptic depression of the calyx of Held synapse by GABA(B) receptors and spontaneous activity. *J Physiol* 591:4877-4894.
- Waroux O, Massotte L, Alleva L, Graulich A, Thomas E, Liégeois JF, Scuvée-Moreau J, Seutin V (2005) SK channels control the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 22:3111-3121.
- Webb TI, Lynch JW (2007) Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des* 13:2350-2367.
- Wei DS, Mei YA, Bagal A, Kao JP, Thompson SM, Tang CM (2001) Compartmentalized and binary behavior of terminal dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Science* 293:2272-2275.
- Weltzien F, Puller C, O'Sullivan GA, Paarmann I, Betz H (2012) Distribution of the glycine receptor  $\beta$ -subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody. *J Comp Neurol* 520:3962-3981.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396:679-682.
- Willard FH, Ryugo DK (1983) *The Auditory Psychobiology of the Mouse*. Springfield, IL: Charles C Thomas Publisher.
- Wolfart J, Neuhoff H, Franz O, Roeper J (2001) Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci* 21:3443-3456.
- Womack MD, Chevez C, Khodakhah K (2004) Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 24:8818-8822.
- Wright CE, Angus JA (1997) Prolonged cardiovascular effects of the N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist omega-conotoxin GVIA in conscious rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:392-399.
- Wu LG, Westenbroek RE, Borst JG, Catterall WA, Sakmann B (1999) Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* 19:726-736.
- Wu SH, Oertel D (1986) Inhibitory circuitry in the ventral cochlear nucleus is probably mediated by glycine. *J Neurosci* 6:2691-2706.
- Wu SH, Kelly JB (1995) Inhibition in the superior olivary complex: pharmacological evidence from mouse brain slice. *J Neurophysiol* 73:256-269.
- Wu Y, Wang HY, Lin CC, Lu HC, Cheng SJ, Chen CC, Yang HW, Min MY (2011) GABAB receptor-mediated tonic inhibition of noradrenergic A7 neurons in the rat. *J Neurophysiol* 105:2715-2728.

- Wulff H, Kolski-Andreaco A, Sankaranarayanan A, Sabatier JM, Shakkottai V (2007) Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Curr Med Chem* 14:1437-1457.
- Wässle H, Heinze L, Ivanova E, Majumdar S, Weiss J, Harvey RJ, Haverkamp S (2009) Glycinergic transmission in the Mammalian retina. *Front Mol Neurosci* 2:6.
- Wölfel M, Lou X, Schneggenburger R (2007) A mechanism intrinsic to the vesicle fusion machinery determines fast and slow transmitter release at a large CNS synapse. *J Neurosci* 27:3198-3210.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395:503-507.
- Xiao L, Michalski N, Kronander E, Gjoni E, Genoud C, Knott G, Schneggenburger R (2013) BMP signaling specifies the development of a large and fast CNS synapse. *Nat Neurosci* 16:856-864.
- Xu J, Wojcik WJ (1986) Gamma aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: blockade by islet-activating protein. *J Pharmacol Exp Ther* 239:568-573.
- Yan L, Suneja SK, Potashner SJ (2007) Protein kinases regulate glycine receptor binding in brain stem auditory nuclei after unilateral cochlear ablation. *Brain Res* 1135:102-106.
- Yang H, Zhang G, Cui J (2015) BK channels: multiple sensors, one activation gate. *Front Physiol* 6:29.
- Yang YM, Aitoubah J, Lauer AM, Nuriya M, Takamiya K, Jia Z, May BJ, Huganir RL, Wang LY (2011) GluA4 is indispensable for driving fast neurotransmission across a high-fidelity central synapse. *J Physiol* 589:4209-4227.
- Yang Z, Cromer BA, Harvey RJ, Parker MW, Lynch JW (2007) A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem* 103:580-589.
- Ye JH, Wang F, Krnjevic K, Wang W, Xiong ZG, Zhang J (2004) Presynaptic glycine receptors on GABAergic terminals facilitate discharge of dopaminergic neurons in ventral tegmental area. *J Neurosci* 24:8961-8974.
- Yoon BE, Woo J, Chun YE, Chun H, Jo S, Bae JY, An H, Min JO, Oh SJ, Han KS, Kim HY, Kim T, Kim YS, Bae YC, Lee CJ (2014) Glial GABA, synthesized by monoamine oxidase B, mediates tonic inhibition. *J Physiol* 592:4951-4968.
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC (2015) The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67:821-870.
- Zarbin MA, Wamsley JK, Kuhar MJ (1981) Glycine receptor: light microscopic autoradiographic localization with [<sup>3</sup>H]strychnine. *J Neurosci* 1:532-547.
- Zhang XB, Sun GC, Liu LY, Yu F, Xu TL (2008) Alpha2 subunit specificity of cyclothiazide inhibition on glycine receptors. *Mol Pharmacol* 73:1195-1202.
- Zhorov BS, Bregestovski PD (2000) Chloride channels of glycine and GABA receptors with blockers: Monte Carlo minimization and structure-activity relationships. *Biophys J* 78:1786-1803.





## Přílohy

Blahoš J, Havlíčková M, Ziková A, Trojanová J, **Hrušková B** & Franková D (2003) Aktivace G-proteinů metabotropními glutamátovými receptory a GABA<sub>B</sub> receptory. *Chem. Listy* 97: 10-13

Havlickova M, Blahos J, Brabet I, Liu J, **Hruskova B**, Prezeau L, Pin JP (2003) The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptors recognizes C termini of G-protein alpha-subunits. *J Biol Chem* 278(37): 35063-70

Kumpost J, Syrova Z, Kulihova L, Frankova D, Bologna JC, Hlavackova V, Prezeau L, Kralikova M, **Hruskova B**, Pin JP, Blahos J (2008) Surface expression of metabotropic glutamate receptor variants mGluR1a and mGluR1b in transfected HEK293 cells. *Neuropharmacology*. 55(4): 409-18

**Hruskova B**, Trojanova J, Kulik A, Kralikova M, Pysanenko K, Bures Z, Syka J, Trussell LO, Turecek R (2012) Differential distribution of glycine receptor subtypes at the rat calyx of Held synapse. *J Neurosci* 32(47):17012-24.

Wang T, Rusu SI, **Hruskova B**, Turecek R, Borst JG (2013) Modulation of synaptic depression of the calyx of Held synapse by GABA(B) receptors and spontaneous activity. *J Physiol*. 591(19):4877-94